

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Curso de Pós-Graduação em
Biologia Celular

Camila Megale de Almeida Leite

Lesão neuronal *in vitro* mediada por óxido
nítrico derivado de macrófagos e células da
glia infectados por *Trypanosoma cruzi* e
ativados por Interferon- γ

Belo Horizonte
2008

Camila Megale de Almeida Leite

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Lesão neuronal *in vitro* mediada por óxido nítrico derivado de macrófagos e células da glia infectados por *Trypanosoma cruzi* e ativados por Interferon- γ

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Biologia Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Biologia
Celular

Orientadora: Prof^a. Rosa Maria Esteves Arantes

Belo Horizonte
2008

Esta tese foi desenvolvida no
Laboratório de Neuro-Imuno
Patologia Experimental (NIPE) do
Departamento de Patologia Geral do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais,
sob orientação da
Prof^a. Rosa Maria Esteves Arantes,
com o auxílio financeiro da
CAPES, FAPEMIG e OMS.

RESUMO

As lesões neuronais e a desnervação periférica na Doença de Chagas estão relacionadas à inflamação local, embora os mecanismos patogênicos envolvidos não estejam completamente esclarecidos. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do óxido nítrico e da citocina fator de necrose tumoral α (TNF- α) derivados de macrófagos peritoneais ou de células da glia periféricas na lesão de neurônios simpáticos *in vitro*, após infecção por *T.cruzi* e ativação por interferon γ (IFN- γ). A redução da sobrevivência neuronal e da densidade de neuritos em co-culturas de neurônios e macrófagos do tipo selvagem (WT) infectadas por *T.cruzi* e ativadas por interferon- γ se correlacionou com dosagens significativas de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas e com expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) por imunocitoquímica. Co-culturas de neurônios e macrófagos geneticamente deficientes para iNOS infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ falhou em reproduzir a redução da sobrevivência neuronal e da densidade de neuritos. Adicionalmente, o tratamento farmacológico com droga inibidora de iNOS aminoguanidina em co-culturas de neurônios e macrófagos WT infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ reverteu a lesão neuronal observada. Em contrapartida, a produção da citocina TNF- α nas co-culturas não se correlacionou com redução significativa da sobrevivência neuronal. Dessa maneira, ficou evidente que o óxido nítrico derivado de iNOS é a molécula efetora da lesão neuronal observada neste modelo *in vitro*, o que contribui para o entendimento dos mecanismos envolvidos na desnervação periférica observada na Doença de Chagas. O modelo de cultura de células da glia do gânglio simpático cervical superior apresentou-se viável e foi eficiente para estudar a infecção por *T.cruzi* nesse tipo celular. As células da glia infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ apresentaram-se parasitadas e produziram quantidades significativas de óxido nítrico, em níveis semelhantes aos observados para os macrófagos nas mesmas condições. Esses dados sugerem a participação das células da glia na lesão neuronal, o que pode ter implicação patogênica na lesão neuronal presente na Doença de Chagas, bem como nos instigam a estudar aspectos mal compreendidos da biologia das células da glia em face da sua resposta à infecção pelo *T.cruzi*, indicando novas abordagens investigativas dentro da linha de pesquisa do nosso grupo.

ABSTRACT

Neuronal lesions and peripheral denervation in Chagas' disease are related to local inflammation; however, the pathogenic mechanisms of neuronal lesions in the heart and megavisceras are still unclear. The aim of this work was to investigate the involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor α (TNF- α) production by *T.cruzi*-infected and interferon- γ (IFN- γ) activated macrophages and peripheral glial cells on neuronal lesion *in vitro*. *T.cruzi*-infected and IFN- γ -activated co-cultures of neurons and wild type (WT) macrophages showed significant reduction of both neuronal survival and neurite density, which was correlated with levels of NO and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by immunocytochemistry. Neither neuronal survival nor the neurite density was affected in co-cultures when macrophages were harvested from iNOS-deficient mice. Moreover, neuronal survival rate in the co-cultures was recovered to control levels by treatment of the cultures with the iNOS inhibitor, aminoguanidine. There was no defined correlation between TNF- α and neuronal survival in this model. These results demonstrate that iNOS-derived NO is the major molecule involved in neuronal damage mechanism in this *in vitro* model, which add to the understanding of the mechanisms involved in the peripheral denervation observed in Chagas' disease. The establishment of glial cell culture model was successful and efficient to study the *T.cruzi* infection in this cell type. *T.cruzi*-infected and IFN- γ activated glial cell cultures showed parasitized cells and the NO production was similar to macrophage cultures NO production under the same conditions. These data suggest a role for glial cells in neuronal lesion, although its defined role requires further investigation, which can contribute to the understanding of the pathogenesis underlying Chagas' disease neuropathology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	aminoguanidina
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
AP-1	proteína ativadora 1
Ara-C	arabinosídeo-C
ATP	adenosina tri-fosfato
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CO₂	gás carbônico
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclreto
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK	proteína quinase regulada por sinal extracelular
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
G	cultura de células da glia
GCS	gânglio cervical superior
GFAP	proteína ácida fibrilar da glia
GI	cultura de células da glia ativada por IFN- γ
GLPS	cultura de células da glia ativada por LPS
GLPSI	cultura de células da glia ativada por LPS e por IFN- γ
GPI	glicoproteína semelhante à mucina ancorada em glicosilfosfatidilinositol
GT	cultura de células da glia infectada por <i>T. cruzi</i>
GTI	cultura de células da glia infectada por <i>T. cruzi</i> e ativada por IFN- γ
H/H	solução de Hanks tamponada com solução Hepes
H₃PO₄	ácido fosfórico
HCl	ácido clorídrico
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-γ	interferon γ
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-1β	interleucina 1 α
iNOS	enzima óxido nítrico sintase induzida
iNOS-/-	geneticamente deficiente para iNOS
IRAK	proteína quinase associada ao receptor de IL-1
JNK	proteína quinase do N terminal de c-Jun
LPS	lipopolissacáride
M	cultura de macrófagos WT
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MEM	Minimum Essential Medium
MI	cultura de macrófagos WT ativada por IFN- γ

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MLPS	cultura de macrófagos WT ativada por LPS
MLPSI	cultura de macrófagos WT ativada por LPS e por IFN- γ
MT	cultura de macrófagos WT infectada por <i>T.cruzi</i>
MTI	cultura de macrófagos WT infectada por <i>T.cruzi</i> e ativada por IFN- γ
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difeniltetrazólio dodecil
MyD88	fator de diferenciação mielóide 88
N	cultura de neurônios
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeos
NaNO₂	nitrito de sódio
NEED	diamina-di-hidroclorido naftaleno
NF-κB	fator nuclear κ B
NGF	fator de crescimento nervoso
NI	cultura de neurônios ativada por IFN- γ
NIPE	Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental
NM	co-cultura de neurônios e macrófagos WT
NMI	co-cultura de neurônios e macrófagos WT ativada por IFN- γ
NMiNOS-/-	co-cultura de neurônios e macrófagos iNOS-/-
NMiNOS-/-I	co-cultura de neurônios e macrófagos iNOS-/- ativada por IFN- γ
NMiNOS-/-T	co-cultura de neurônios e macrófagos iNOS-/- infectada por <i>T.cruzi</i>
NMiNOS-/-TI	co-cultura de neurônios e macrófagos iNOS-/- infectada por <i>T.cruzi</i> e ativada por IFN- γ
NMT	co-cultura de neurônios e macrófagos WT infectada por <i>T.cruzi</i>
NMTI	co-cultura de neurônios e macrófagos WT infectada por <i>T.cruzi</i> e ativada por IFN- γ
NMTIAG100	co-cultura de neurônios e macrófagos WT infectada por <i>T.cruzi</i> e ativada por IFN- γ com aminoguanidina a 100 μ M
NMTIAG30	co-cultura de neurônios e macrófagos WT infectada por <i>T.cruzi</i> e ativada por IFN- γ com aminoguanidina a 30 μ M
NMTIAG300	co-cultura de neurônios e macrófagos WT infectada por <i>T.cruzi</i> e ativada por IFN- γ com aminoguanidina a 300 μ M
nNOS	enzima óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NO⁻²	nitrito
NO⁻³	nitrato
OMS	Organização Mundial de Saúde
OH⁻	radical hidroxila
p.i.	pós-infecção ou pós intervenções
PAMP	padrão molecular associado ao patógeno
PBS	solução tampão fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PGP9.5	produto protéico do gene 9.5
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

rpm	rotações por minuto
SDS	sulfato de sódio
SEM	erro padrão da média
SFB	soro fetal bovino
SIF	células pequenas intensamente fluorescentes
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central
SNE	sistema nervoso entérico
SNP	sistema nervoso periférico
SSP4	proteína recombinante de antígeno de superfície específico de amastigotas de <i>T.cruzi</i>
STAT	transdutor de sinais e ativador de transcrição
TGF-β	fator de crescimento transformante β
TLR	receptor do tipo Toll
TNF-α	fator de necrose tumoral α
TRAF6	fator 6 ativado pelo receptor de TNF
TrkA	receptor tirosina quinase A
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
USP	Universidade de São Paulo
WT	tipo selvagem ou <i>wild type</i>

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A neurobiologia tem sido alvo de inúmeros estudos ao redor do mundo nas últimas décadas em função das características peculiares que o sistema nervoso apresenta. Dentre essas características, pode-se citar a localização privilegiada pela existência e função da barreira hematoencefálica, a grande extensão do território que abrange, os requisitos que células com geometria tão complexa como a dos neurônios necessitam para realizar suas funções e a transmissão de informações através do espaço extracelular (Aschner e Syversen, 2004). Além disso, é sabido que a população neuronal normalmente se estabelece logo após o nascimento e que os neurônios maduros em geral não se dividem, embora a neurogênese em adultos tenha sido comprovada (Mackowiak, Chocyk *et al.*, 2004). Estudos recentes demonstraram a formação de novos neurônios em cérebros adultos de diversos mamíferos, como rato (Altman e Das, 1965; 1966; Kaplan e Hinds, 1977; Gould, Cameron *et al.*, 1992), coelho (Gueneau, Privat *et al.*, 1982), camundongo (Kempermann, Kuhn *et al.*, 1997) e humanos (Eriksson, Perfilieva *et al.*, 1998), através de células tronco que se dividem e se diferenciam em neurônios ou células da glia. Esse processo de neurogênese está estabelecido como um mecanismo adicional de neuroplasticidade e diversos trabalhos têm sugerido as consequências desse modo de neuroadaptação (Schaffer e Gage, 2004). A neurogênese tem chamado muita atenção da comunidade científica mundial e sua aceitação constitui parte da mudança de paradigma da estabilidade do cérebro adulto (Gross, 2000).

1.1 Aspectos gerais sobre o Sistema Nervoso e o Gânglio Cervical Superior (GCS)

Os neurônios do sistema nervoso periférico (SNP) se localizam em gânglios, juntamente com células da glia, enquanto seus axônios estão localizados em nervos. O SNP é constituído pelo sistema nervoso periférico somático, responsável pela movimentação voluntária dos músculos esqueléticos e pelas sensações oriundas de estímulos internos e externos, e pelo sistema nervoso autônomo (SNA), responsável pela inervação das vísceras, glândulas salivares e lacrimais, coração, vasos sanguíneos e todos os outros músculos lisos do corpo. O SNA, que se subdivide em simpático e parassimpático, possui grande autonomia em relação ao sistema nervoso central (SNC), enquanto o SNP somático está sob controle direto do SNC. No entanto, esses dois sistemas estão em constantes interações e apresentam características estruturais, fisiológicas e farmacológicas semelhantes. O sistema nervoso entérico (SNE) é considerado uma subdivisão do SNA em função de suas propriedades

particulares, como a independência que os neurônios dos gânglios das paredes do trato gastrointestinal apresentam em relação ao SNA. O SNE regula as funções de secreção, absorção e motilidade do trato gastrointestinal (Purves, Augustine *et al.*, 2001).

Os neurônios periféricos autonômicos se originam de células da crista neural que migram do tubo neural para as regiões onde os gânglios são formados. Após diferenciação em neurônios, os axônios migram para uma variedade de alvos (Young, Anderson *et al.*, 2004).

Os neurônios dos gânglios simpáticos, que serão alvo deste estudo, são multipolares, com grande variabilidade de aparência em seus prolongamentos. A maioria deles são noradrenérgicos e apresentam positividade para reação imunocitoquímica à tirosina hidroxilase, uma enzima essencial na síntese das catecolaminas (Masliukov e Timmermans, 2004). Os gânglios simpáticos apresentam populações neuronais com propriedades neuroquímicas e funcionais distintas de acordo com sua localização na cadeia periférica (Lindh, Lundberg *et al.*, 1989; Morris, Gibbins *et al.*, 1989; Gibbins, 1992). Diversas vias de sinalização foram identificadas e descritas como importantes na regulação da síntese de neurotransmissores, expressão gênica, excitabilidade neuronal e resposta a fatores de crescimento nos neurônios simpáticos (Roivainen e Koistinaho, 1996).

O GCS é considerado um bom modelo para correlações entre morfologia, função e metabolismo dos neurônios. Esse gânglio tem uma organização relativamente simples (Roivainen e Koistinaho, 1996). As características das células da glia e dos neurônios do GCS foram descritas em estudos histológicos, sobretudo em ratos. O GCS apresenta arquitetura tecidual definida e os seus componentes incluem neurônios principais, células pequenas intensamente fluorescentes (SIF) e células da glia satélites que envolvem completamente os neurônios e suas ramificações (Chiba e Williams, 1975; Hedger e Webber, 1976; Madariaga-Domich e Taxi, 1986). Estímulos fisiológicos, injúria e envelhecimento causam alterações morfológicas no GCS. Além disso, esse gânglio mantém transmissão sináptica e alta taxa metabólica durante incubações *in vitro* (Roivainen e Koistinaho, 1996).

1.2 Os modelos de cultura de neurônios simpáticos e de co-cultura de neurônios simpáticos e macrófagos peritoneais

Os estudos *in vitro* apresentam-se como uma ferramenta científica complementar e independente para estudar aspectos específicos de problemas *in vivo*, que são complexos em função da grande quantidade de variáveis envolvidas. A primeira cultura descrita foi a cultura

de células do tecido nervoso no início do século passado (Hamburger, 1993; Alberts, Johnson *et al.*, 2002). Assim como outras áreas de pesquisa básica e aplicada, a neurobiologia vem, desde então, utilizando modelos *in vitro* de cultura celular e de tecidos para estudar a dinâmica do desenvolvimento (Laerum, Steinsvag *et al.*, 1985), a plasticidade de neurotransmissores (Jonakait, 1993), a ação de agentes neurotóxicos e drogas (Aschner e Syversen, 2004; Lonchamp, Dupont *et al.*, 2006) e as interações neurônio-específicas (Lonchamp, Dupont *et al.*, 2006). A abordagem *in vitro* da neurobiologia apresenta diversas vantagens em relação à abordagem *in vivo* devido à possível seleção de neurônios e de diferentes tipos de células da glia para o estabelecimento das culturas, além de permitir o estudo direto das interações entre células (Laerum, Steinsvag *et al.*, 1985), a manipulação do ambiente extracelular e a observação direta (Tiffany-Castiglioni, 1993). Adicionalmente, é importante citar os desafios no delineamento experimental e na interpretação dos resultados que os modelos de cultura celular e tecidual oferecem (Tiffany-Castiglioni, 1993).

Embora muitos estudos utilizem linhagens celulares geneticamente modificadas, como células imortalizadas e células cancerosas, as células de cultura primária, que são obtidas diretamente de tecidos de um organismo vivo, apresentam-se normalmente diferenciadas e com características morfológicas e funcionais similares às células presentes nos tecidos. Pode-se citar a síntese e secreção de produtos específicos, a capacidade de contração e, no caso de neurônios, a emissão de axônios eletricamente excitáveis e que fazem sinapse com outras células nervosas. A manutenção das propriedades típicas das células originais em células de cultura primária permite o estudo das propriedades celulares que seriam muito menos acessíveis no tecido, demonstrando a sua importância como ferramenta metodológica (Alberts, Johnson *et al.*, 2002).

A cultura primária de neurônios simpáticos do GCS, que vem sendo utilizada por nosso grupo para estudar a lesão neuronal estrutural após ação de diversos estímulos, apresenta algumas particularidades metodológicas como a dependência de Matrigel e de fator de crescimento nervoso (NGF) para a sobrevivência e emissão de prolongamentos *in vitro*. O Matrigel é um gel comercial que mimetiza a matriz extracelular e sua presença nos poços de cultura é essencial à fixação e viabilidade dos neurônios e ao crescimento de neuritos em cultura (Blennerhassett e Bienenstock, 1998; Arantes, Lourenssen *et al.*, 2000). O Matrigel contém componentes da matriz extracelular como laminina, colágeno IV, entactina e proteoglicana heparan sulfato, fatores de crescimento e metaloproteinases de matriz (Vukicevic, Kleinman *et al.*, 1992; Mackay, Gomez *et al.*, 1993) e tem sido utilizado em culturas de diversos tipos celulares pois forma uma reconstituição da membrana basal, com

similaridades em estrutura, composição, propriedades físicas e funcionais à encontrada *in vivo* (Kleinman, McGarvey *et al.*, 1982; Kleinman, Graf *et al.*, 1987; McGuire e Seeds, 1989; Katz, Barrette *et al.*, 1992). Estudos recentes demonstraram que neurônios expressam uma enorme quantidade de genes em resposta aos componentes e à estrutura da matriz extracelular utilizada nas culturas. As complexas interações célula-matriz envolvem a expressão de genes relacionados ao citoesqueleto e ao crescimento de neuritos, além de influenciar a extensão das células em cultura (Li, Livi *et al.*, 2007).

Associadamente aos componentes da matriz extracelular, o NGF também é essencial à sobrevivência de neurônios simpáticos em cultura e sua ausência por um período superior a 18 horas está relacionada à ocorrência de apoptose neuronal (Martin, Schmidt *et al.*, 1988). Além disso, o NGF é necessário à emissão de prolongamentos (Reynolds e Perez-Polo, 1981), à diferenciação (Greene e Tischler, 1976) e ao desenvolvimento de sinapses *in vitro* em células da linhagem PC12 derivadas de feocromocitoma da medula da adrenal de ratos (Zhou, Xu *et al.*, 2006). As vias de sinalização ativadas pelo NGF e envolvidas na sobrevivência neuronal não estão completamente esclarecidas, mas envolvem algumas enzimas como a fosfatidilinositol-3-quinase e a proteína quinase C (Pierchala, Ahrens *et al.*, 2004).

Os neurônios simpáticos do GCS *in vitro*, na presença de NGF, conservam suas principais características morfológicas, preservam sinapses funcionais e outras propriedades eletrofisiológicas (Ko, Burton *et al.*, 1976; Wakshull, Johnson *et al.*, 1979) bem como mostram imunorreatividade para marcadores genéricos de neurônios como o produto protéico do gene 9.5 (PGP9.5) (Arantes, Lourenssen *et al.*, 2000), que permite a visualização dos corpos neuronais e neuritos, facilitando a interpretação de lesões e a sua quantificação.

É possível estudar as interações entre tipos celulares diferentes *in vitro* a partir da utilização de técnicas de co-cultura. As co-culturas que envolvem neurônios e outras células, como células da glia (Melcangi, Galbiati *et al.*, 1995; Gallo, Morale *et al.*, 2000; Turtzo, Marx *et al.*, 2001), adipócitos (Turtzo, Marx *et al.*, 2001), células musculares (Langer, Betti *et al.*, 1994) ou células inflamatórias (Janiszewski, Bienenstock *et al.*, 1990; Arantes, Lourenssen *et al.*, 2000) têm sido utilizadas desde o início da década passada. As co-culturas de células inflamatórias e neurônios têm se mostrado eficientes para investigar aspectos específicos das interações entre a inflamação, seus produtos e o sistema nervoso. As co-culturas de neurônios simpáticos e macrófagos peritoneais foram desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa e têm sido uma ferramenta muito útil para o estudo dos mecanismos celulares responsáveis pelo dano neuronal no contexto da inflamação.

1.3 O processo inflamatório e a lesão neuronal

De forma genérica, a inflamação é uma reação complexa caracterizada por extravasamento de líquido e leucócitos dos vasos sanguíneos com posterior acúmulo nos tecidos, que pode ser desencadeada por diversos estímulos exógenos e endógenos que causam lesão celular. O processo inflamatório se manifesta por fenômenos agudos e crônicos. A fase aguda tem duração curta e caracteriza-se por exsudação de líquido e proteínas plasmáticas (edema) e emigração de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos. Já a fase crônica tem duração longa e o tecido apresenta linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e fibrose. Todos os eventos da inflamação são mediados por fatores químicos oriundos das células e desencadeados pelo estímulo inflamatório. Os mediadores químicos atuam isoladamente ou em combinações e seqüências que amplificam a resposta inflamatória e influenciam a sua evolução. A reação inflamatória tem como objetivos a eliminação do agente lesivo e a reparação do tecido lesado pela agressão. No entanto, a inflamação e a reparação são potencialmente lesivas (Alberts, Johnson *et al.*, 2002).

Nos tecidos acometidos pela inflamação, as células inflamatórias liberam uma série de mediadores como citocinas pró-inflamatórias e citotóxicas, fatores de crescimento, enzimas hidrolíticas e óxido nítrico (NO), que têm sido implicados na patogênese de lesões teciduais resultantes do processo inflamatório e reparativo. Esses produtos de células ativadas podem agir como mediadores primários da lesão tecidual ou participarem da resposta inflamatória, iniciando uma cascata de reações imunológicas adicionais que resultam em lesão tecidual (Laskin e Pendino, 1995).

Com relação ao sistema nervoso, as células inflamatórias e seus produtos estão implicados tanto na regeneração quanto na degeneração de neurônios e células da glia (Perry e Brown, 1992). Embora sejam essenciais para reconstrução dos tecidos lesados, as células inflamatórias podem causar lesão de células nervosas através da liberação de enzimas e mediadores químicos envolvidos na defesa do hospedeiro (Popovich, Guan *et al.*, 1999). A resposta inflamatória celular tem sido implicada no mecanismo de degeneração secundária em injúrias traumáticas da medula espinhal, acentuando o dano tecidual no local do trauma. Macrófagos ativados induzem desmielinização significativa de fibras nervosas periféricas e a produção de fatores citotóxicos e pró-inflamatórios por essas células pode estar implicada na lesão de terminações nervosas nas áreas afetadas pela inflamação (Said e Hontebeyrie-Joskowicz, 1992; Laskin e Pendino, 1995). A proximidade dos macrófagos com axônios e

terminações nervosas sugere que eles estejam associados com a perda de processos neuronais no SNP (Said e Hontebeyrie-Joskowicz, 1992; Venezie, Toews *et al.*, 1995).

Conforme mencionado, o NO é um dos produtos das células inflamatórias que tem sido associado à lesão tecidual e nervosa secundária à inflamação. No entanto, é importante ressaltar que essa molécula está normalmente presente no SNC e está relacionada à liberação e recaptação de neurotransmissores, desenvolvimento neural, plasticidade sináptica, regulação da expressão gênica, neuromodulação e desenvolvimento de aprendizado e memória. No SNA, o NO funciona como um neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico e participa do relaxamento do músculo liso de vasos do cérebro e dos tratos gastrointestinal, urogenital e respiratório (Bredt, 1999). *In vitro*, foi demonstrado que o NO é importante na sobrevivência de neurônios em cultura primária após estímulos lesivos e na promoção da diferenciação neuronal (Contestabile e Ciani, 2004). Seus efeitos são normalmente parácrinos, uma vez que o NO é um gás extremamente difusível que atinge baixas concentrações após pequenos intervalos de tempo (Ledo, Barbosa *et al.*, 2005). Além disso, o NO parece ser um fator importante em processos de regeneração neuronal. Animais geneticamente deficientes para a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), após lesão nervosa periférica, apresentaram perda de neurônios motores e sensitivos nos gânglios dorsais e medula espinhal e um retardamento na regeneração nervosa (Keilhoff, Fansa *et al.*, 2003).

Adicionalmente ao seu papel fisiológico e neuroprotetor, o NO pode exercer efeitos lesivos quando produzido por macrófagos ativados por resposta inflamatória. Os macrófagos produzem NO em resposta a algumas citocinas, como o interferon γ (IFN- γ) (Ding, Nathan *et al.*, 1988) e ao lipopolissacáride (LPS), glicolípido complexo que constitui o componente predominante de paredes celulares de bactérias gram-negativas (Stuehr e Marletta, 1985). Nos macrófagos, o NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) a partir do aminoácido L-arginina (Xie, Cho *et al.*, 1992). Essa síntese ocorre através da ativação de diversas vias de sinalização, que envolvem diversas proteínas quinases, dentre elas as proteínas quinases A (Muroi e Suzuki, 1993) e C (Fujihara, Connolly *et al.*, 1994) e 3 classes de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK): quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) 1 e 2 (Weinstein, Sanghera *et al.*, 1992), a quinase ativada por estresse ou p38 (Han, Lee *et al.*, 1994) e quinases do N terminal de c-Jun (JNK), componente do fator de transcrição proteína ativadora 1 (AP-1) (Hambleton, Weinstein *et al.*, 1996). Essas proteínas quinases vão ativar fatores de transcrição como o fator nuclear κ B (NF- κ B), o transdutor de sinais e ativador de transcrição (STAT) 1 α e a AP-1 que migram para o núcleo e vão induzir a transcrição do gene codificador de iNOS (Blanchette, Jaramillo *et al.*, 2003). Os receptores

primários da sinalização celular envolvida na ativação de iNOS em macrófagos são os receptores do tipo Toll (TLR), proteínas transmembrana essenciais no reconhecimento do padrão molecular característico e invariável dos microorganismos chamado de padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) (Hashimoto, Hudson *et al.*, 1988; Janeway, 1989; Medzhitov, Preston-Hurlburt *et al.*, 1997; Chaudhary, Ferguson *et al.*, 1998; Rock, Hardiman *et al.*, 1998). Esses receptores são expressos predominantemente em células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas (Medzhitov, Preston-Hurlburt *et al.*, 1997).

O NO, como um radical livre, é naturalmente reativo e medeia toxicidade celular por lesão de enzimas metabólicas essenciais (Bredt, 1999). O NO pode se rearranjar em nitrato (NO^{-3}) que se une a um próton para formar o radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$), que é extremamente reativo, e o nitrito (NO^{-2}) (Hutchins e Barger, 1998). No entanto, a grande toxicidade do NO está relacionada ao peroxinitrito que é formado pela reação entre NO e outro radical livre, o ânion superóxido. O peroxinitrito é tão reativo quanto o superóxido, mas é capaz de escapar da inativação pela superóxido-dismutase e interage com lipídeos, ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas (sobretudo em resíduos de tirosina) por reações oxidativas diretas ou por mecanismos indiretos mediados por radicais. Essas reações desencadeiam cascatas de sinalização celular em resposta à injúria oxidativa excessiva, levando às células à morte celular por apoptose ou necrose (Pacher, Beckman *et al.*, 2007). O peroxinitrito pode também ativar a enzima poli-ADP-ribose polimerase, que consome rapidamente o carreador de elétrons nicotinamida adenina dinucleotídeos (NAD) e adenosina tri-fosfato (ATP), que são essenciais para a fosforilação oxidativa e produção de energia, cujo comprometimento pode levar as células à hipóxia e à necrose (Hutchins e Barger, 1998). Adicionalmente à necrose, o NO pode induzir morte celular por apoptose através do aumento da atividade de caspase 3 e da fragmentação do DNA com positividade para a marcação *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling* (TUNEL), sendo que o bloqueio de iNOS demonstrou proteção à apoptose em neurônios cerebelares *in vitro* (Heneka, Feinstein *et al.*, 1999).

Além do NO, a citocina fator de necrose tumoral α (TNF- α) tem sido envolvida na patogênese das lesões neuronais em diversas patologias neurodegenerativas (Barone e Parsons, 2000; Nagatsu, Mogi *et al.*, 2000; Perry, Collins *et al.*, 2001; Veerhuis, Hoozemans *et al.*, 2002) e a sua presença significativa foi comprovada em tecidos nervosos lesados (Tyor, Glass *et al.*, 1992; Wesselingh, Power *et al.*, 1993; Sippy, Hofman *et al.*, 1995). O mecanismo pelo qual o TNF- α causa lesão neuronal envolve o aumento de cálcio intracelular, com perda da homeostase celular e morte celular por necrose ou apoptose (Lipton, 1998; Foos

e Wu, 2002). No entanto, assim como para o NO, o tempo e a extensão da exposição ao TNF- α podem trazer diferentes respostas neuronais. Foi relatado que essa citocina pode ter efeito neuroprotetor pela diminuição da concentração de cálcio e peróxido no citoplasma (Barger, Horster *et al.*, 1995), menor expressão de receptores para citocinas (Han, Wang *et al.*, 2001), abertura de canais de potássio (Barger, Horster *et al.*, 1995) e ativação do NF- κ B (Chen e Goeddel, 2002).

1.4 As células da glia e a lesão neuronal

Paralelamente ao papel dos macrófagos e seus produtos na lesão neuronal, vários estudos relataram o papel das células da glia na degeneração ou proteção neuronal em patologias neurodegenerativas de diversas naturezas.

As células da glia compreendem os astrócitos, microgliócitos e oligodendrócitos no SNC e as células de Schwann, células da glia entéricas e células satélites no SNP (Purves, Augustine *et al.*, 2001; Jessen, 2004). Esses tipos celulares podem ser distinguidos pelas suas características morfológicas e pela expressão de marcadores de lipídeos e proteínas antigênicos (Dawson, Levine *et al.*, 2000). Os astrócitos guiam o desenvolvimento neuronal, regulam as concentrações extracelulares de íons, metabólitos e neurotransmissores e suportam as sinapses e funções neuronais. Eles são identificados pela expressão do filamento intermediário proteína ácida fibrilar da glia (GFAP) (Hansson e Ronnback, 2003). Os oligodendrócitos formam a mielina no SNC (Pfeiffer, Warrington *et al.*, 1993; Miller, 2002), enquanto as células de Schwann realizam a mesma função no SNP (Purves, Augustine *et al.*, 2001; Chan, 2007). Os microgliócitos são leucócitos residentes no SNC, que se ativam e realizam fagocitose em resposta a estímulos danosos (Purves, Augustine *et al.*, 2001). Cada uma dessas células da glia tem recebido crescente atenção da comunidade científica em função do seu estabelecido papel em doenças neurodegenerativas (Garden e Moller, 2006; Dewil, Van Den Bosch *et al.*, 2007; Skaper, 2007; Von Bernhardi, 2007). Além disso, mesmo doenças degenerativas que não envolvem a participação direta de células da glia cursam com dano às células não neuronais, como astrócitos e microgliócitos, cuja participação nos mecanismos de toxicidade pode ser contribuinte ou mesmo desencadeante da doença (Lobsiger e Cleveland, 2007).

No SNC, a neurodegeneração mediada por inflamação envolve a ativação da micróglia que produz fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, como o NO, que lesam os neurônios (Chao, Hu *et al.*, 1992; Saha e Pahan, 2006). O NO, metabólito mais tóxico produzido por

micróglia ativada por IFN- γ , pode causar lesão neuronal durante a infecção por *Toxoplasma gondii* (Rozenfeld, Martinez et al., 2005). As citocinas e o NO estão significativamente implicados na lesão e morte neuronal nos pacientes com demência que apresentam corpos de Lewy (Katsuse, Iseki et al., 2003). Os fatores e as drogas que tem potencial neurotóxico ou neuroprotetor devem essas propriedades às suas capacidades de induzir ou reduzir, respectivamente, a ativação da micróglia em produzir citocinas, NO e fatores com potencial neurotóxico que acarretam dano neuronal (Wang, Lin et al., 2002; Carreno-Muller, Herrera et al., 2003; Eskes, Juillerat-Jeanneret et al., 2003; Eyupoglu, Bechmann et al., 2003; Liu, Qin et al., 2003).

Com relação ao SNP, há inúmeras sugestões da participação das células da glia na resposta ganglionar a distúrbios sistêmicos circulatórios ou envolvendo degeneração e regeneração de fibras nervosas simpáticas (Schreiber, Vaccariello et al., 2002; Liutkiene, Stropus et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que células de Schwann podem expressar iNOS em resposta à lesão nervosa periférica (Lee, Park et al., 2007). Por outro lado, a literatura concernente à participação das células da glia do GCS em processos patológicos recebe pouca atenção da literatura e limita-se a apenas alguns estudos (Elfvin, Bjorklund et al., 1987; Roivainen e Koistinaho, 1990; Schreiber, Vaccariello et al., 2002; Liutkiene, Stropus et al., 2007), sendo que raros abordam a expressão de iNOS. Células positivas para iNOS não foram detectadas em GCSs de ratos normais, no entanto, após lesão do nervo vago, muitas células apresentaram-se positivas por imunocitoquímica para iNOS nos GCSs em cultura por 24 e 48 horas (Magnusson, Alm et al., 1996). No entanto, a expressão de iNOS especificamente em células da glia do GCS só foi relatada em um único trabalho com abordagem *in vivo*, após injeções intraganglionares de colchicina (Vanhatalo, Lumme et al., 1998).

Em contrapartida ao papel das células da glia na lesão neuronal, é sabido que células da micróglia e astrócitos liberam, além de produtos neurotóxicos, substâncias neuroprotetoras que inibem a apoptose neuronal induzida pelo NO (Toku, Tanaka et al., 1998; Tanaka, Toku et al., 1999) e que são importantes nos mecanismos de reparo do tecido lesado (Hansson e Ronnback, 2003). Em um estudo *in vitro*, a glia está relacionada à estabilização de culturas de neurônios simpáticos por induzir o crescimento de neuritos através da produção de proteínas que estimulam a expansão dessa rede de prolongamentos (Lein, Beck et al., 2002). Além disso, as células da glia podem liberar neurotransmissores que modulam a sensibilidade sináptica de neurônios, participam na formação das sinapses e exercem papel importante na proteção do sistema nervoso (Hansson e Ronnback, 2003).

1.5 A lesão neuronal na Doença de Chagas

A inflamação foi implicada no acometimento de neurônios e terminações nervosas do SNA e do SNE na Doença de Chagas (Koberle e De, 1960; Koberle, 1968; 1970; Machado e Ribeiro, 1989; Adad, Cancado *et al.*, 2001).

A Doença de Chagas é uma infecção parasitária, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que pode causar no homem uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante, que afeta principalmente o coração e tubo gastrointestinal. Dezesseis a 18 milhões de pessoas apresentam-se acometidas por essa patologia, que é endêmica exclusivamente em países das Américas Central e do Sul (Who, 2002).

O *T.cruzi* é naturalmente transmitido ao ser humano após a picada do barbeiro, inseto vetor triatomíneo. A transmissão vetorial ocorre quando o barbeiro defeca próximo ao local da picada após se alimentar do sangue do hospedeiro. Suas fezes contêm formas tripomastigotas metacíclicas infectantes que penetram o local da picada ou as mucosas. Os tripomastigotas infectam macrófagos ou outras células, onde se diferenciam em formas intracelulares amastigotas. As células parasitadas se rompem e liberam vários amastigotas e tripomastigotas que podem infectar outras células ou penetrar na corrente sanguínea e infectar tecidos distantes. Outras formas de transmissão incluem a transmissão oral, via transplacentária, transfusões sanguíneas, transplante de órgãos ou acidentes em laboratórios (Tanowitz, Kirchhoff *et al.*, 1992; Who, 2002).

A infecção é caracterizada por fases aguda e crônica de acordo com a parasitemia, o parasitismo tecidual e com o tipo de resposta imune. A fase aguda cursa com parasitemia detectável e com parasitismo tecidual intenso em células musculares cardíacas, esqueléticas e lisas, bem como em células da glia (Tanowitz, Kirchhoff *et al.*, 1992). Essa fase tem duração de aproximadamente 60 dias, sendo que há predomínio dos elementos diretamente relacionados ao *T.cruzi*. Ela pode ser sintomática, com manifestações locais de porta de entrada, quadro clínico toxêmico-febril transitório e processo inflamatório intenso. A fase aguda, no entanto, ocorre muito mais freqüentemente de maneira assintomática, sem manifestações aparentes. A fase crônica é caracterizada por parasitemia dificilmente detectável e parasitismo tecidual escasso, podendo ser assintomática ou sintomática. Os sintomas, quando presentes, aparecem muitos anos após a fase aguda e a resposta imunitária do paciente parece ser de alta importância na patogênese das lesões. Dependendo da área geográfica, 20 % a 35 % dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica sintomática, com lesões irreversíveis no SNA do coração e no SNE do esôfago e cólon. No Brasil, 15 % a

30 % dos indivíduos infectados desenvolvem cardiopatia chagásica e 10 % desenvolvem a forma digestiva, com lesões irreversíveis do SNP (Moncayo, 2003).

Estudos anteriores relataram que o coração e o tubo gastrointestinal acometidos pela Doença de Chagas apresentam diminuição acentuada de células nervosas em seus gânglios, sendo que a morte dessas células ocorre na fase aguda da doença. As alterações funcionais clinicamente relevantes, como os distúrbios da motilidade do trato gastrointestinal, foram atribuídas à redução significativa do número de neurônios e à conseqüente desnervação dos órgãos acometidos (Koberle, 1968; 1970).

A maioria dos materiais humanos é de pacientes acometidos pela Doença de Chagas na fase crônica, o que dificulta o estudo das lesões neuronais diretas durante os fenômenos iniciais da fase aguda. Em função disso, muitos modelos experimentais da fase aguda em animais foram desenvolvidos com a evidência de inflamação, parasitismo tecidual intenso e alterações do SNP (Camargos e Machado, 1988; Machado e Ribeiro, 1989).

A desnervação periférica foi observada em vários órgãos inervados pelo sistema nervoso simpático ou parassimpático em modelo experimental da Doença de Chagas em ratos jovens (Machado, Machado *et al.*, 1978; Machado, Alves *et al.*, 1984; Machado e Ribeiro, 1989). Foi demonstrado que a desnervação no coração pode ocorrer por lesões das terminações nervosas simpáticas, independentemente da lesão nos corpos neuronais (Camargos, Haertel *et al.*, 1996).

Inúmeros mecanismos de destruição neuronal foram propostos desde o início dos estudos das lesões do tecido nervoso na Doença de Chagas. A presença de uma neurotoxina liberada pelas formas amastigotas desintegradas foi postulada inicialmente (Koberle, 1968), no entanto, tal possibilidade não foi comprovada. O parasitismo neuronal como mecanismo de lesão direta foi levantado, mas posteriormente refutado, pois, embora o *T.cruzi* infecte diversos tipos celulares, os neurônios são raramente parasitados (Koberle, 1968; Tafuri, 1970; Tanowitz, Brosnan *et al.*, 1982; Garcia, Paula *et al.*, 1999; Da Mata, Camargos *et al.*, 2000; Arantes, Marche *et al.*, 2004). Na dissertação de mestrado (Almeida-Leite, 2004), nós descartamos de modo definitivo o parasitismo direto como causa de morte neuronal, uma vez que culturas de neurônios simpáticos infectadas por *T.cruzi* não apresentaram neurônios parasitados ou diminuição da sobrevivência neuronal até 48 horas pós-infecção (p.i.). Estudo recente demonstrou que o *T.cruzi*, via sua neuraminidase, liga-se ao receptor tirosina quinase A (TrkA) de NGF nos neurônios, inibindo a sua ativação por NGF, mas induzindo ativação do TrkA e conseqüente sobrevivência neuronal e crescimento de neuritos (Chuenkova e Pereiraperrin, 2004). Além disso, foi evidenciado que o parasito tem habilidade para proteger

células cardíacas *in vitro* da morte celular por apoptose (Petersen, Krumholz *et al.*, 2006). Adicionalmente, estudo utilizando modelo canino de cardiopatia chagásica observou que a morte celular por apoptose ocorria em células não infectadas por *T. cruzi* e que era provavelmente desencadeada pela liberação de mediadores inflamatórios tóxicos (Zhang, Andrade *et al.*, 1999). Esses estudos reforçam nossa hipótese de que o parasito não deve exercer dano neuronal de modo direto.

A inflamação da cápsula dos gânglios e o parasitismo de células da glia são descritos como fatores relacionados com a lesão neuronal (Tafari, 1970; Tanowitz, Brosnan *et al.*, 1982) ao lado da ação de células citotóxicas e de anticorpos (Khoury, Ritacco *et al.*, 1979; Petry e Van Voorhis, 1991). Existem evidências da resposta imunológica cruzada dirigida contra antígenos do hospedeiro e antígenos do *T. cruzi* (Khoury, Ritacco *et al.*, 1979; Petry e Van Voorhis, 1991). Alguns estudos sugeriram a existência de anticorpos que poderiam interagir com os receptores adrenérgicos na membrana celular neuronal e modular o seu funcionamento (Sterin-Borda, Pascual *et al.*, 1989; Ferrari, Levin *et al.*, 1995). No entanto, as evidências de envolvimento da imunidade humoral como um fator patogênético irrefutável têm sido enfraquecidas pela falência em se demonstrar a reatividade cruzada entre antígenos de *T. cruzi* e do hospedeiro, pelo reconhecimento de que os anticorpos são heterófilos (Kierszenbaum, 1999) e pela observação da persistência de parasitos e de seus produtos, detectados por técnicas mais sensíveis tais como imunocitoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR) (Vago, Macedo *et al.*, 1996; Higuchi, Ries *et al.*, 1997; Gomes, Macedo *et al.*, 1998). Apesar de que várias dessas hipóteses ainda necessitam ser descartadas por estudos *in vitro*, a tendência atual é considerar que um componente autoimune ocorra como epifenômeno da reação inflamatória desencadeada pela presença do parasito no tecido (Kierszenbaum, 1999).

Foi relatada uma relação direta entre a presença do parasito, a ocorrência de inflamação desencadeada pelos seus antígenos, lesões subseqüentes determinadas pelo processo inflamatório e reparativo e a doença nos hospedeiros infectados (Tarleton e Zhang, 1999). No entanto, a reação inflamatória não está diretamente proporcional à quantidade de parasitos no tecido (Higuchi, Ries *et al.*, 1997). A correlação entre a persistência de parasitos, seus antígenos ou DNA e a ocorrência de lesões inflamatórias se apresenta como base para uma teoria patogênética que deve ser testada com relação ao acometimento do tecido nervoso na Doença de Chagas. Nesse caso a reação inflamatória seria o processo responsável pelos fenômenos degenerativos que atingiriam o corpo neuronal e as terminações nervosas e torna-se importante definir os mecanismos da lesão nervosa operante.

Diversos estudos em modelos animais experimentais de Doença de Chagas têm corroborado a hipótese de que a lesão neuronal ocorra como uma consequência do processo inflamatório envolvendo o parasito (Tafuri, 1970; Tanowitz, Brosnan *et al.*, 1982). A participação importante de células radio sensíveis como linfócitos no processo de desnervação noradrenérgica do coração de ratos infectados por *T.cruzi* foi afastada, favorecendo o papel dos macrófagos na lesão de terminações nervosas durante a fase aguda da doença (Melo e Machado, 1998).

O papel das células da glia na lesão neuronal observada na Doença de Chagas não foi esclarecido. Há evidências de que o *T.cruzi* é capaz de infectar astrócitos no SNC em modelo experimental de Doença de Chagas em ratos (Da Mata, Camargos *et al.*, 2000). O parasitismo de células da glia no SNA foi observado na fase aguda em modelos experimentais murinos (Tafuri, 1970; Arantes, Marche *et al.*, 2004). O único estudo *in vitro* disponível na literatura que relaciona células da glia e Doença de Chagas utilizou culturas organotípicas de medula espinhal e gânglio da raiz dorsal infectadas por *T.cruzi*. Foram evidenciadas alterações morfológicas tais como edema e distorções dos neuritos. O parasitismo neuronal direto não foi o mecanismo implicado nessas lesões e a hipótese de que as células acessórias como a glia ou os macrófagos infectados estariam mediando a lesão neuronal foi levantada (Tanowitz, Brosnan *et al.*, 1982).

1.6 O óxido nítrico e outros produtos inflamatórios na Doença de Chagas

O NO, produto de macrófagos ativados, é a molécula efetora da citotoxicidade mediada por macrófagos dirigida a diversos microorganismos, dentre eles o *T.cruzi*, mas também tem um papel importante na lesão tecidual observada na Doença de Chagas (Vespa, Cunha *et al.*, 1994; Garcia, Paula *et al.*, 1999; Ny, Persson *et al.*, 1999; Chandra, Tanowitz *et al.*, 2002; Pinto, Torres-Hillera *et al.*, 2002).

Na fase aguda da infecção experimental por *T.cruzi*, a dosagem plasmática das citocinas IFN- γ e TNF- α apresenta-se aumentada (Starobinas, Russo *et al.*, 1991; Balligand, Ungureanu-Longrois *et al.*, 1994; Silva, Vespa *et al.*, 1995) e associa-se com o aumento da concentração plasmática de nitritos (Vespa, Cunha *et al.*, 1994). As citocinas IFN- γ e TNF- α são capazes de ativar sinergisticamente os macrófagos a adquirir capacidade tripanocida. Os macrófagos ativados por IFN- γ , na presença de *T.cruzi*, produzem TNF- α , que atua de maneira autócrina exacerbando a produção de NO (Silva, Vespa *et al.*, 1995). A produção

elevada de NO correlaciona-se com a atividade tripanocida dos macrófagos. Foi sugerido, então, que o IFN- γ e o TNF- α estão envolvidos na ativação de macrófagos e na morte das formas intracelulares de *T.cruzi* através de um mecanismo dependente de NO (Munoz-Fernandez, Fernandez *et al.*, 1992).

Conseqüentemente, a resistência à infecção pelo *T.cruzi* tem sido associada à capacidade de geração de IFN- γ por linfócitos, que ativa macrófagos a produzir NO, a principal molécula efetora no controle da multiplicação intracelular do parasito (Gazzinelli, Oswald *et al.*, 1992; Vespa, Cunha *et al.*, 1994). Animais resistentes à infecção por *T.cruzi* produzem níveis de NO altos e passíveis de detecção no soro e no sobrenadante de cultura de células desses animais. Ao tratar esses animais com inibidores de iNOS, a parasitemia e a mortalidade sofrem um aumento significativo. Além disso, a presença de droga doadora de NO mostrou-se capaz de matar tripomastigotas *in vitro*. Em conjunto, esses dados sugerem um mecanismo direto do NO na morte do parasita e o no controle da infecção (Vespa, Cunha *et al.*, 1994), embora estudo recente tenha demonstrado que a infecção pode ser controlada por outros mecanismos imunológicos efetores na ausência de NO (Cummings e Tarleton, 2004).

Paralelamente à produção das citocinas IFN- γ e TNF- α indutoras de iNOS, outras citocinas como fator de crescimento transformante β (TGF- β) e interleucina 10 (IL-10) são secretadas durante a infecção e atuam como reguladores negativos da produção de NO (Silva, Machado *et al.*, 2003). A produção persistente e simultânea das citocinas IFN- γ , TNF- α e TGF- β , durante o curso da doença de Chagas experimental foi confirmada, embora não se tenha conseguido demonstrar uma correlação entre o padrão de citocinas produzidas com a susceptibilidade dos animais à infecção (Zhang e Tarleton, 1996).

Além das células inflamatórias, diversos outros tipos celulares infectados por *T.cruzi* expressam ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para citocinas tais como TNF- α , e interleucina 1 β (IL-1 β), quimiocinas e iNOS. Células do hospedeiro estimuladas por IFN- γ , IL-1 β e TNF- α ou por quimiocinas produzem níveis críticos de NO que controlam a replicação do *T.cruzi*. A produção de NO por miócitos em resposta a TNF- α e IL-1 β (Mikami, Kawashima *et al.*, 1996; Kinugawa, Shimizu *et al.*, 1997) e a presença dessas citocinas no coração de ratos infectados por *T. cruzi* foram relatadas (Okura, Yamamoto *et al.*, 1997; Chandrasekar, Melby *et al.*, 1998). A liberação de citocinas e quimiocinas pelas células infectadas pode ser essencial não só para a produção local de NO como para a modulação do

recrutamento de células inflamatórias para os tecidos infectados (Machado, Martins *et al.*, 2000).

Em culturas de cardiomiócitos infectados por *T.cruzi*, observou-se produção de NO e expressão de RNAm para iNOS, TNF- α e quimiocinas. A ativação de iNOS e a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por essas células estão provavelmente relacionadas com o controle do crescimento do parasito, a entrada dos parasitos nas células e a produção local de NO, o que pode contribuir para o entendimento da patogênese da cardiomiopatia chagásica (Machado, Martins *et al.*, 2000).

O NO, embora tenha papel no controle da infecção e esteja relacionado com a resistência à doença, parece suprimir a resposta imune ao *T.cruzi* por induzir apoptose em linfócitos T e tem sido associado à disfunção miocárdica (Silva, Machado *et al.*, 2003) e à lesão tecidual (Vespa, Cunha *et al.*, 1994; Garcia, Paula *et al.*, 1999; Ny, Persson *et al.*, 1999; Chandra, Tanowitz *et al.*, 2002; Pinto, Torres-Hillera *et al.*, 2002). Os seus efeitos benéficos ou maléficos são determinados pela magnitude e duração de sua produção (James, 1995).

O *T.cruzi* potencializa a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ através do aumento da síntese de RNAm para iNOS e da enzima propriamente dita. Essa potencialização ocorre através da ativação concomitante das MAPK ERK1/ERK2 e p38 e do fator de transcrição NF- κ B. Além disso, a geração de NO em macrófagos infectados por *T.cruzi* é controlada no nível pós-transcricional, através de um aumento na estabilidade do RNAm para iNOS, que é desencadeado pelo parasito (Bergeron e Olivier, 2006). Adicionalmente ao papel do parasito na produção de NO, foi demonstrado que antígenos de sua superfície são eficientes na indução de produção de NO por macrófagos. Proteína recombinante de antígeno de superfície específico de amastigotas de *T.cruzi* (SSP4) e glicoproteínas semelhantes à mucina ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *T.cruzi* se mostraram capazes de estimular a produção de NO por macrófagos peritoneais ativados por IFN- γ (Camargo, Andrade *et al.*, 1997; Ramos-Ligonio, Lopez-Monteon *et al.*, 2004).

1.7 O óxido nítrico e a lesão neuronal na Doença de Chagas

Com relação à lesão neuronal secundária à inflamação e à produção de NO na Doença de Chagas, foi sugerida uma correlação entre a produção de NO e a perda de células ganglionares no trato gastrointestinal em ratos infectados pelo *T.cruzi* (Garcia, Paula *et al.*, 1999).

Em estudo *in vivo* anterior do nosso grupo, foi relatado que a desnervação do trato gastrointestinal na fase aguda da infecção experimental murina por *T.cruzi* é dependente da produção de NO. Embora camundongos geneticamente deficientes para iNOS (iNOS^{-/-}) apresentassem presença mais pronunciada de ninhos de parasitos e de infiltrado inflamatório na parede intestinal, eles não apresentaram diminuição no número de neurônios do plexo mientérico após infecção aguda por *T.cruzi*. Além disso, animais geneticamente deficientes para IFN- γ também não apresentaram perda neuronal ou infiltrado inflamatório na parede intestinal. A partir desse trabalho, ficou demonstrado que o dano neuronal não ocorre em animais onde a geração de NO é ausente, independentemente da presença ou ausência de infiltrado inflamatório. Assim, a desnervação mientérica que ocorre nesse modelo de fase aguda da Doença de Chagas é consequência da produção de NO decorrente da ativação de iNOS por IFN- γ no foco inflamatório (Arantes, Marche *et al.*, 2004). No entanto, nesse estudo a fonte de NO não pôde ser esclarecida em função da presença de diversos tipos celulares no tecido *in vivo*, tais como macrófagos no foco inflamatório e células da glia nos gânglios intramurais acometidos. Dessa forma, o papel do NO derivado de células da glia não pôde ser excluído, assim como o papel do NO derivado de macrófagos não pôde ser comprovado na gênese das lesões nervosas.

Em estudo anterior (Almeida-Leite, 2004), descrevemos a lesão neuronal em co-culturas de neurônios e macrófagos infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ . Realizamos a avaliação quantitativa da sobrevida neuronal e observamos que a infecção por *T.cruzi* e a concomitante ativação por IFN- γ dos macrófagos em co-cultura com neurônios acarretou uma diminuição progressiva da sobrevida neuronal para 73, 49 e 40 % em relação às culturas controle às 24, 48 e 72 horas pós infecção (p.i.), respectivamente (**FIGURA 1A**). Muitos neurônios apresentaram alterações degenerativas indicativas de morte celular por necrose ou apoptose, sendo que esta foi confirmada pela marcação por TUNEL. Os macrófagos estavam frequentemente parasitados e imunopositivos para iNOS, o que nos permitiu sugerir que a morte neuronal estaria sendo mediada, pelo menos parcialmente, pelo NO derivado de macrófagos infectados por *T.cruzi* e ativados por IFN- γ .

Além da lesão do corpo celular, observamos uma redução de 60 % na densidade de neuritos nas co-culturas de neurônios e macrófagos infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ às 48 horas p.i. (**FIGURA 1B**). A perda de neuritos observada em nosso modelo merece investigações mais aprofundadas com novas abordagens investigativas, como a utilização de modelo de cultura compartimentalizada, nos quais os corpos neuronais são mantidos em

ambiente distinto de seus prolongamentos, permitindo correlacionar a relação de neurônios com seus neuritos individualmente e a presença de regenerações em seus prolongamentos (Campenot, 1982). No entanto, nossos dados do acometimento dos neuritos independentemente de lesões nos corpos neuronais têm importância patogenética, pois, como mencionado anteriormente, a desnervação na Doença de Chagas pode ocorrer por diminuição de terminações nervosas sem comprometimento de corpo celular (Camargos, Haertel *et al.*, 1996).

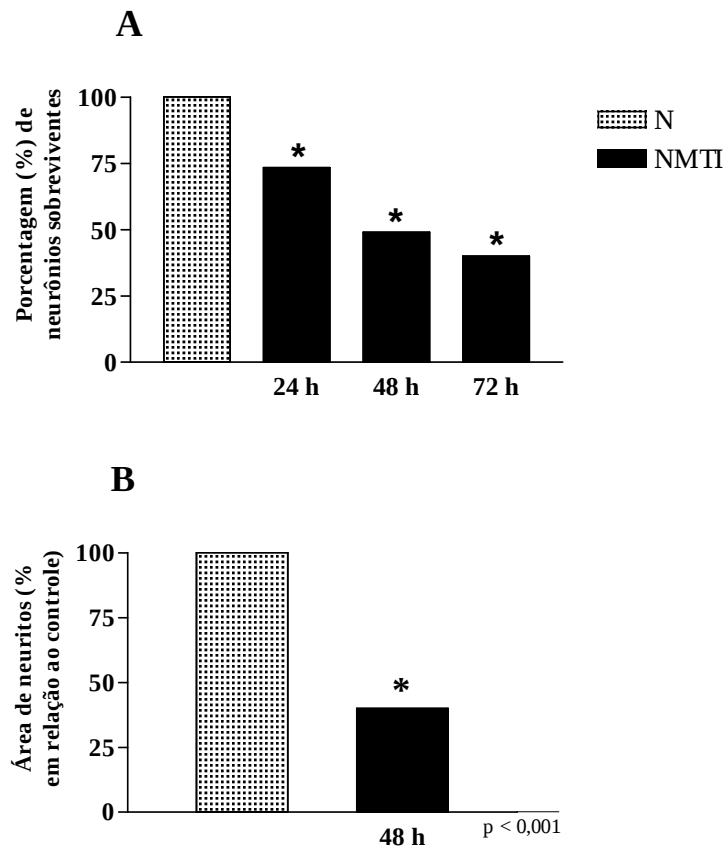


FIGURA 1 – Sobrevida neuronal e densidade de neuritos em co-culturas de neurônios e macrófagos infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ (NMTI). Redução significativa da sobrevida neuronal (A) às 24, 48 e 72 h p.i. e da densidade de neuritos (B) às 48 h p.i. nas co-culturas de neurônios e macrófagos infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ (NMTI) em relação ao controle (N). N = 3 experimentos independentes em triplicatas por condição experimental, *p<0,001 em relação ao controle, teste t não pareado e Mann-Whitney.

Nota: N = neurônio, NMTI = neurônio + macrófago + *T.cruzi* + IFN- γ .

2 JUSTIFICATIVA

As observações já referidas anteriormente implicam o macrófago e as células da glia diretamente, ou através de seus produtos, na gênese das lesões de corpos celulares e fibras nervosas em geral, e em lesão das terminações nervosas autonômicas na Doença de Chagas. Dentre os produtos dessas células ativadas, o estudo do NO apresenta-se relevante dentro do contexto de morte neuronal na infecção por *T.cruzi*, devido à sua importância na patogenia da Doença de Chagas e nas lesões neuronais em geral.

A partir das evidências de lesão neuronal mediada por NO no modelo *in vivo* anteriormente realizado pelo grupo, a utilização de co-cultura de neurônios simpáticos e macrófagos peritoneais apresentou-se interessante para esclarecer o papel isolado e específico do parasito, dos macrófagos, das células da glia e dos seus produtos, dentre eles o NO, no mecanismo de injúria neuronal.

A partir dos dados descritos na dissertação de mestrado, o mecanismo de lesão neuronal mediado pelo NO sugerido só poderia ser confirmado através da dosagem de NO nos sobrenadantes das co-culturas e de experimentos com ausência ou bloqueio farmacológico da produção de NO.

No presente trabalho, abordamos a lesão de neurônios simpáticos na infecção por *T.cruzi in vitro*, visando definir a participação do NO no mecanismo de lesão neuronal através da dosagem de nitrito nos sobrenadantes das co-culturas infectadas e ativadas, da utilização de macrófagos de animais iNOS^{-/-} e do uso de droga inibidora de iNOS.

Além disso, pretendemos esclarecer, através de culturas de células da glia infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ , o comportamento dessas células quanto à produção de NO e seu provável papel na gênese das lesões ou na proteção dos elementos do sistema nervoso na Doença de Chagas.

3 OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Investigar o efeito do óxido nítrico (NO) derivado de macrófagos peritoneais ou de células da glia periféricas, na lesão de neurônios simpáticos *in vitro*, após infecção por *T.cruzi* e ativação por IFN- γ .

3.2 – Objetivos Específicos

Utilizamos co-culturas de neurônios simpáticos e macrófagos peritoneais infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ com o intuito de:

- Avaliar a produção de NO e correlacioná-la à sobrevida neuronal e à densidade de neuritos;
- Relacionar a ausência de NO através de macrófagos iNOS-/- e de bloqueio farmacológico de iNOS à sobrevida neuronal e à densidade de neuritos;
- Avaliar a produção de TNF- α e correlacioná-la à sobrevida neuronal;

Após padronização de modelo de cultura de células da glia do GCS e caracterização fenotípica das células, utilizamos as culturas de células da glia do GCS e culturas de macrófagos peritoneais com o intuito de:

- Realizar a infecção por *T.cruzi* e a ativação por IFN- γ ;
- Estudar a resposta celular à infecção por *T.cruzi* quanto ao parasitismo celular e à produção de NO comparativamente.

6 DISCUSSÃO

Em continuação aos resultados obtidos anteriormente, nós utilizamos o modelo de co-cultura primária de neurônios e macrófagos para estudar a lesão neuronal estrutural do corpo celular e dos neuritos, bem como a sua quantificação, após infecção por *T.cruzi in vitro*, visando atribuir um papel específico para o NO no mecanismo da lesão neuronal observada. Adicionalmente, padronizamos um modelo de cultura primária de células da glia do GCS para estudar o comportamento dessas células frente à infecção por *T.cruzi in vitro*, com o objetivo de contribuir para o esclarecimento do papel dessas células nas lesões neuronais observadas na Doença de Chagas. Conforme mencionado anteriormente, o modelo de co-cultura primária de neurônios simpáticos e macrófagos peritoneais vem sendo utilizado pelo nosso grupo e permite a caracterização e quantificação da lesão neuronal *in vitro*.

É importante ressaltar que as culturas primárias demandam uma metodologia que requer treinamento mais complexo, mas que é recompensador em vista das vantagens já citadas, como a manutenção das propriedades típicas das células originais. O número de células ganglionares para plaqueamento é uma limitação do nosso modelo, em função de diversos fatores, tais como a ausência de multiplicação neuronal *in vitro*, o tamanho reduzido dos gânglios e a existência de apenas um par de gânglios por animal. Conseqüentemente, essa técnica torna-se mais trabalhosa em função da necessidade de desenvolvimento e treinamento de habilidades manuais para otimizar o número de gânglios e de células obtidos por experimento, além de exigir repetição de grande número de experimentos. Nas culturas de células da glia utilizamos, inicialmente, a densidade celular de 10^4 células/ poço, como utilizado para os neurônios, no entanto, adaptações metodológicas foram feitas para se conseguir plaquear 10^5 células/poço e otimizar a detecção de nitritos no sobrenadante. A quantidade limitada de células, no entanto, não compromete a utilização desse modelo, a interpretação das lesões e suas quantificações.

Nos nossos experimentos, observamos que a utilização de Matrigel e de NGF seleciona os neurônios simpáticos, enquanto a utilização de Matrigel em concentrações mais diluídas, conforme descrito para tipos celulares não neuronais (Li, Aggeler *et al.*, 1987; Kubota, Kleinman *et al.*, 1988), e o não fornecimento de NGF e Ara-C favorecem o crescimento das células da glia do GCS em detrimento dos neurônios.

Nossas culturas primárias de neurônios apresentaram aspectos semelhantes aos descritos em trabalhos que utilizam neurônios do GCS *in vitro* (Blennerhassett e Bienenstock, 1998; Arantes, Lourenssen *et al.*, 2000), com um padrão homogêneo de distribuição, presença

de neurônios típicos preservados e de inúmeros prolongamentos entrelaçados e imunopositividade para PGP9.5.

As co-culturas de neurônios e macrófagos obtidas por nós apresentaram, conforme descrito anteriormente, macrófagos em contato com corpos neuronais e neuritos. A imunomarcagem para CD68 e F4/80 confirmou que a maioria das células presentes em co-cultura com neurônios era macrófagos. O plaqueamento de 10 macrófagos por neurônio, conforme realizado por nós, garante uma proporção média de 7 macrófagos por neurônio, como anteriormente descrito (Arantes, Lourenssen *et al.*, 2000), e reproduz a proximidade e as interações entre esses tipos celulares que ocorrem *in vivo*.

Dentre as várias estratégias metodológicas possíveis, optamos por utilizar os modelos já referidos de cultura primária de neurônios e de células da glia do GCS e de co-cultura primária de neurônios simpáticos e macrófagos peritoneais para estudar as interações entre esses tipos celulares e a lesão neuronal no contexto da Doença de Chagas. Embora a significância biológica do acometimento dos neurônios do GCS não seja clara em modelo experimental dessa doença (Camargos e Machado, 1988), nosso interesse foi abordar a lesão de neurônios simpáticos em modelos de cultura já estabelecidos por nosso grupo. Objetivamos, assim, estudar o efeito de produtos inflamatórios derivados de macrófagos e células da glia infectados por *T.cruzi* e ativados por IFN- γ na sobrevida e estrutura neuronal *in vitro*. Esta estratégia visa contribuir para o esclarecimento do mecanismo da lesão neuronal que acontece na Doença de Chagas e que já foi exaustivamente descrita em material humano (Koberle, 1970) e em estudos experimentais em ratos e camundongos (Machado, Machado *et al.*, 1978; Machado, Alves *et al.*, 1984; Machado e Ribeiro, 1989; Arantes, Marche *et al.*, 2004).

Assim como anteriormente levantado e demonstrado em outros trabalhos (Tafari, 1970; Khoury, Ritacco *et al.*, 1979; Garcia, Paula *et al.*, 1999), acreditamos que as degenerações e lesões neuronais que acontecem na Doença de Chagas estejam principalmente relacionadas às reações imunoinflamatórias e seus produtos, que são desencadeadas pelos parasitos e/ou seus antígenos nos tecidos onde os corpos neuronais e as terminações nervosas estão inseridos (Tafari, 1970; Khoury, Ritacco *et al.*, 1979).

Considerando que a fonte de NO responsável pela lesão neuronal não pôde ser definida no modelo experimental *in vivo* de infecção por *T.cruzi* utilizado pelo nosso grupo, a utilização de co-culturas de neurônios e macrófagos apresentou-se como uma ferramenta importante para esclarecer o papel específico dos macrófagos e do NO no mecanismo da injúria neuronal.

Em sequência aos dados descritivos obtidos na dissertação de mestrado, confirmamos o mecanismo de lesão neuronal provocada pelo NO através da dosagem de NO nos sobrenadantes das co-culturas e da manutenção da sobrevivência neuronal na ausência de produção de NO por macrófagos de camundongos iNOS^{-/-}, ou após o bloqueio farmacológico da produção de NO, que foram realizados durante o doutorado e que serão discutidos a seguir.

Apesar da existência de técnicas capazes de detectar concentrações mais baixas de NO, como métodos fluorimétricos que medem a formação de agentes nitrosantes, utilizamos a reação de *Griess* para a dosagem de nitrito no sobrenadante como uma determinação indireta da produção de NO. O método de *Griess* é amplamente utilizado na literatura, constitui um ensaio prático e econômico e envolve a medida espectrofotométrica do nitrito obtida pela redução do nitrato presente em fluidos (Tarpey, Wink *et al.*, 2004).

As co-culturas de neurônios e macrófagos WT infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ apresentaram dosagens de nitrito significativamente superiores aos controles nos 3 tempos estudados, confirmando a produção de NO no nosso modelo, em conjunto com a expressão de iNOS em macrófagos parasitados e imunopositivos para F4/80. É importante ressaltar que os níveis de NO aumentaram ao longo do tempo, o que demonstra que os macrófagos infectados por *T.cruzi* e ativados por IFN- γ produzem NO de maneira contínua durante todo o período experimental em estudo. No tempo de 72 horas p.i., a quantidade de nitrito dosada se refere a um período de 48 horas, uma vez que os meios dessas co-culturas foram trocados às 24 horas p.i. para garantir o fornecimento de NGF aos neurônios a cada 48 horas.

Os níveis de nitritos dosados nos nossos experimentos variaram de 5 a 9 μ M. Em estudos *in vitro* utilizando macrófagos ou células do baço com infecção por *T.cruzi* e ativação por IFN- γ , as dosagens de nitrito apresentaram-se entre 30 e 50 μ M às 48 ou 72 horas p.i., no entanto, a quantidade de células por poço de cultura foi 10 vezes superior (10^6) à utilizada em nosso modelo (10^5) (Munoz-Fernandez, Fernandez *et al.*, 1992; Vespa, Cunha *et al.*, 1994; Silva, Vespa *et al.*, 1995). Em contrapartida, estudo utilizando cardiomiócitos com infecção por *T.cruzi* e ativação por IFN- γ apresentou níveis de nitrito em torno de 10 μ M, sendo a quantidade de células também em torno de 10^6 (Machado, Martins *et al.*, 2000). A quantidade de macrófagos por poço de cultura (10^5) utilizada por nós é justificada pelo fato de que não desejamos o obscurecimento dos neurônios co-cultivados com os macrófagos, o que dificultaria a detecção das alterações morfológicas e a quantificação das lesões. Além disso,

nosso modelo de co-cultura que utiliza 10 macrófagos por neurônio tende a reproduzir a proximidade e a interação entre essas células que ocorreria *in vivo*.

O IFN- γ na infecção natural por *T.cruzi* é produzido sobretudo por linfócitos (Gazzinelli, Oswald *et al.*, 1992; Vespa, Cunha *et al.*, 1994). No nosso modelo, nós adicionamos essa citocina diretamente aos macrófagos infectados por *T.cruzi* para reproduzir o mecanismo de ativação de macrófagos anteriormente descrito (Drapier, Wietzerbin *et al.*, 1988). Nós utilizamos concentração de IFN- γ (200 UI/ml) e quantidade de tripomastigotas por célula (10) superiores às utilizadas em outros estudos (100 UI/ml e 5 parasitos/célula) (Silva, Vespa *et al.*, 1995; Machado, Martins *et al.*, 2000) com o intuito de conseguir inequivocamente detectar níveis de nitrito, apesar da quantidade reduzida de células. Portanto, nossas dosagens de nitrito inferiores às obtidas em outros estudos estão proporcionais à quantidade de células utilizada nos nossos experimentos.

A produção de NO nas co-culturas de neurônios e macrófagos WT infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ nos permite afirmar que o NO presente em nosso sistema é derivado da atividade da enzima iNOS e que sua produção aumentada nas co-culturas infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ se correlaciona com a morte neuronal de 27, 51 e 60% em relação aos controles nos tempos de 24, 48 e 72 horas p.i., respectivamente, e com a redução de 60 % da densidade de neuritos às 48 horas p.i. Esses dados identificam claramente a interação entre macrófagos infectados por *T.cruzi* e ativados por IFN- γ como a causa primária de lesão neuronal e que pode ser fortemente responsável pela perda neuronal progressiva e pelas conseqüentes alterações na síndrome estrutural e funcional que caracteriza as megavísceras observadas na Doença de Chagas. Nós acreditamos que os níveis de NO e a conseqüente morte neuronal observada no nosso modelo mimetizam as condições da infecção por *T.cruzi in vivo*. A perda neuronal de 60% observada por nós às 72 horas p.i. está de acordo com a perda de neurônios no plexo mientérico descrita em modelos experimentais (Arantes, Marche *et al.*, 2004) e em estudos humanos (Koberle, 1970; Adad, Cancado *et al.*, 2001).

Nosso foco neste trabalho foi implicar o NO derivado de iNOS como um mediador importante nas lesões neuronais observadas no nosso modelo. Com o intuito de demonstrar inequivocamente a participação do NO derivado de iNOS, utilizamos macrófagos iNOS-/- e observamos que as co-culturas de neurônios e macrófagos iNOS-/- infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ não apresentaram uma diminuição no número de neurônios em nenhum dos 3 tempos estudados ou na densidade de neuritos às 48 horas p.i. em relação às cultura

controle, apesar da presença de macrófagos infectados e de debris celulares nos poços de cultura. A presença de debris celulares nas co-culturas de neurônios e macrófagos iNOS^{-/-} infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ pode ser justificada pela ineficiência do controle da multiplicação intracelular do parasito pelos macrófagos na ausência de NO, conforme já demonstrado em diversos estudos anteriores (Gazzinelli, Oswald *et al.*, 1992; Vespa, Cunha *et al.*, 1994), o que pode levar a um maior comprometimento da viabilidade dos macrófagos infectados. A inabilidade de produção de NO por macrófagos iNOS^{-/-} infectados por *T.cruzi* e ativados por IFN- γ , conforme comprovado pelas dosagens não significativas de NO nos nossos experimentos, além da ausência de redução da sobrevivência neuronal evidenciam que as lesões neuronais observadas no nosso modelo de co-cultura são certamente dependentes de NO derivado de iNOS.

Adicionalmente à utilização de macrófagos iNOS^{-/-}, utilizamos o bloqueio farmacológico específico de iNOS em macrófagos WT como uma ferramenta adicional para confirmar a participação do NO derivado de iNOS na lesão neuronal observada. A droga inibidora de iNOS AG, independentemente da concentração utilizada, bloqueou a perda neuronal observada nas co-culturas de neurônios e macrófagos WT infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ não tratadas em relação ao controle às 48 horas p.i. Além disso, não observamos comprometimento qualitativo da rede neurítica (dado não quantificado).

Com relação à produção de NO, evidenciamos que o bloqueio farmacológico de iNOS foi eficiente, uma vez que a dosagem de NO foi reduzida de modo dose-dependente, já que em todas as 3 concentrações utilizadas (30, 100 e 300 μ M) foi possível observar redução significativa na dosagem de nitrito em relação às co-culturas de neurônios e macrófagos WT infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ que não receberam a droga. A dose de 100 μ M demonstrou ser a dose mais eficiente para recuperar a sobrevivência neuronal em valores absolutos e em análises qualitativas, sem significância estatística em relação às outras concentrações, apesar da redução da dosagem de nitrito ter sido mais eficiente na dose de 300 μ M. Isso está de acordo com outros trabalhos que utilizam a dose mínima de 200 μ M para efetivamente bloquear a produção de NO (Machado, Martins *et al.*, 2000). Na concentração de 30 μ M, a produção de NO foi reduzida em relação às co-culturas sem tratamento, no entanto, ainda apresentou valores estatisticamente superiores aos valores dos controles, que, no entanto, não se correlacionaram com diminuição significativa da sobrevivência neuronal.

Esses dados demonstram que a concentração de NO está diretamente relacionada ao grau de lesão neuronal e que doses baixas não causam dano quantitativo relevante.

Acreditamos que há um limite de concentração de NO que é suportável pelos neurônios, sem alterações evidentes e comprometimento de sua viabilidade, uma vez que níveis de NO inferiores a 3 μ M não comprometeram a sobrevivência neuronal de modo significativo no nosso modelo. Os neurônios necessitam suportar concentrações fisiológicas de NO, já que essa molécula exerce papel importante em diversos processos fisiológicos, como a neurotransmissão nos SNC e SNP (Dawson, Dawson *et al.*, 1992; Yun, Dawson *et al.*, 1997; Dawson e Dawson, 1998). Baixas concentrações de NO parecem exercer papéis fisiológicos, enquanto altas concentrações podem ser neurotóxicas pelo aumento do estresse oxidativo (Dawson, Dawson *et al.*, 1992; Yun, Dawson *et al.*, 1997; Dawson e Dawson, 1998; Liaudet, Soriano *et al.*, 2000; Keilhoff, Fansa *et al.*, 2003; Moncada e Bolanos, 2006; Conti, Miscusi *et al.*, 2007), corroborando nossas evidências de que comprometimento significativo da sobrevivência neuronal *in vitro* depende das concentrações de NO. Dessa forma o papel do NO como lesivo ou não aos neurônios em nosso modelo, mostrou-se dependente da sua concentração.

Independentemente da concentração de AG utilizada, assim como nas co-culturas com macrófagos iNOS-/- onde a produção de NO também foi ausente, foi possível observar células da glia residuais e macrófagos frequentemente parasitados, amastigotas de *T.cruzi* e debris celulares nos poços de cultura. Assim como anteriormente referido, a baixa produção de NO deve acarretar, no nosso modelo, um comprometimento dos macrófagos em controlar a infecção, o que justifica a presença de macrófagos degenerados e em processos de morte celular, levando à presença de debris celulares nas co-culturas. A ausência de morte neuronal na provável presença de quantidades superiores de parasitos nas co-culturas em que a produção de NO foi ausente confirma nossa hipótese, levantada a partir dos dados da dissertação de mestrado, de que o mecanismo de lesão neuronal não é diretamente relacionado ao parasito, mas sim a efeitos indiretos da sua presença, como a ativação de macrófagos e produção de NO.

Os mecanismos neuroprotetores que foram evidenciados por outros como consequência da ação direta do *T.cruzi* sobre neurônios (Chuenkova e Pereiraperrin, 2004) são uma evidência adicional de que o mecanismo de lesão neuronal na infecção por *T.cruzi* é indireto e dependente de ativação de outros tipos celulares em resposta ao parasito. Os mecanismos de interação direta do *T.cruzi* com os neurônios e suas consequências na sinalização neuronal estão sendo investigados atualmente em nosso laboratório.

É importante ressaltar que a ativação de iNOS na infecção por *T.cruzi* pode ocorrer de maneira independente de IFN- γ , que, no entanto, não parece ser eficiente no controle

intracelular do parasito (Rottenberg, Castanos-Velez *et al.*, 1996). A participação do NO produzido independentemente de IFN- γ não parece ser relevante na lesão neuronal, uma vez que o estudo *in vivo* realizado anteriormente por nosso grupo não evidenciou diminuição do número de neurônios mientéricos em animais deficientes para IFN- γ (Arantes, Marche *et al.*, 2004). Além disso, na ausência de ativação por IFN- γ , não documentamos lesão neuronal no nosso modelo atual.

É interessante ressaltar que, uma vez demonstrado o papel de antígenos de superfície do *T.cruzi* na indução de produção de NO por macrófagos (Camargo, Almeida *et al.*, 1997; Ramos-Ligonio, Lopez-Monteon *et al.*, 2004), a utilização alternativa dessas moléculas para ativar macrófagos no nosso modelo poderia resultar em dano neuronal semelhante ao observado na presença do parasito. No entanto, essas inferências merecem investigação futura.

Conforme mencionado anteriormente, é sabido que o NO pode ter efeitos lesivos relevantes em diversas patologias neurodegenerativas (Chao, Hu *et al.*, 1992; Heneka, Feinstein *et al.*, 1999; Wang, Lin *et al.*, 2002; Liu, Qin *et al.*, 2003; Rozenfeld, Martinez *et al.*, 2005), conforme demonstrado por nós na infecção por *T.cruzi in vitro*, onde estão envolvidos mecanismos de morte celular por necrose e apoptose. Além do NO, a formação de outros radicais livres como os intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio derivados da atividade de iNOS, que pode ser detectados por quimiluminescência (Trush, Van Dyke *et al.*, 1977), não foi abordada neste estudo.

Paralelamente à produção de NO, observamos que a infecção por *T.cruzi* e a ativação por IFN- γ de co-culturas de neurônios e macrófagos WT levaram a dosagens de TNF- α mais altas em relação às culturas controle às 48 horas p.i. Isso está de acordo com estudos anteriores que demonstraram alta produção de TNF- α e sinergismo entre produção de NO e de TNF- α em infecção por *T.cruzi* (Starobinas, Russo *et al.*, 1991; Silva, Vespa *et al.*, 1995; Zhang e Tarleton, 1996). Nesse tipo de infecção, as citocinas IFN- γ e TNF- α ativam sinergisticamente a iNOS, acarretando em produção elevada de NO que está diretamente relacionada à capacidade dos macrófagos em eliminar formas intracelulares de *T.cruzi* através de um mecanismo dependente de NO (Munoz-Fernandez, Fernandez *et al.*, 1992). A detecção de NO e de TNF- α nas nossas co-culturas demonstra a capacidade do modelo em reproduzir as condições anteriormente descritas para culturas de macrófagos e de células do baço frente à infecção por *T.cruzi* e ativação por IFN- γ , validando a utilização do nosso modelo como ferramenta de estudo apropriada.

No nosso modelo, não podemos atribuir um papel definido para o TNF- α no mecanismo da lesão neuronal observada por nós. Embora dosagens de TNF- α se apresentem mais altas em co-culturas com diminuição da sobrevivência neuronal em comparação às condições controle, as dosagens de TNF- α também se apresentaram aumentadas em condições experimentais que não evoluíram com morte neuronal como co-culturas de neurônios e macrófagos iNOS-/- infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ às 24 horas p.i. e co-culturas de neurônios e macrófagos WT infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ com bloqueio farmacológico às 48 horas p.i..

A experiência de cultivar células da glia do GCS de camundongos não parece ter precedentes na literatura, embora existam alguns relatos de culturas de glia desses gânglios de ratos (Ludlam, Chandross *et al.*, 1995; Lein, Beck *et al.*, 2002). Uma grande contribuição do nosso trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de cultura de células da glia baseado na experiência anterior de nosso grupo com a cultura de neurônios, através da diluição do Matrigel e da modificação do protocolo de dissociação enzimática e mecânica, que foi mais vigoroso e utilizou tripsina e EDTA. Além disso, não foi adicionado NGF ou Ara-C, para evitar a seleção de neurônios, favorecendo o crescimento das células da glia. Conforme demonstrado, após o plaqueamento, evidenciamos divisão celular, de modo qualitativo e quantitativo, por um período de tempo. Isso está de acordo com trabalhos que demonstram a capacidade de proliferação de astrócitos de camundongos neonatos *in vitro* (Korr, Siewert *et al.*, 1992) e de células da glia no GCS *in vivo* (Hall e Landis, 1992). Cerca de 10 dias pós plaqueamento, as células estavam bem distribuídas e viáveis, apresentaram-se com aspecto homogêneo, como células planas e com características morfológicas semelhantes aos descritos para células satélites do GCS *in vivo* (Hall e Landis, 1992).

A utilização de marcadores antigênicos célula-específicos permite a identificação de tipos celulares neuronais e não neuronais em culturas dissociadas do SNC e do SNP (Kennedy, 1982). Devido ao caráter original de nossos dados e à ausência de um parâmetro definido por estudos prévios, estudamos paralelamente a expressão imunocitoquímica dos potenciais marcadores de antígenos de células da glia em culturas e em GCSs de camundongos neonatos e adultos processados para histologia (dados não mostrados). Nos nossos tecidos, a arquitetura tecidual e o aspecto morfológico do GCS foram semelhantes aos anteriormente descritos, com neurônios e células da glia satélites (Chiba e Williams, 1975; Madariaga-Domich e Taxi, 1986), o que nos permitiu correlacionar a expressão dos marcadores com os tipos celulares.

O anticorpo anti-GFAP, um marcador genérico de células acessórias da glia, foi utilizado para caracterizar as células da glia nas nossas culturas. Vários trabalhos anteriores apresentaram o marcador GFAP como característico de astrócitos do SNC (Eng, 1985), de glia do SNE (Jessen e Mirsky, 1980), de células de Schwann (Jessen, Thorpe *et al.*, 1984) e de células satélites ganglionares (Jessen e Mirsky, 1985) do SNP. Com relação aos gânglios simpáticos, alguns estudos revelaram células da glia positivas em humanos (Koistinaho, 1990) e gatos (Alvarez, Solas *et al.*, 1989). No entanto, com relação ao GCS, apenas um estudo relata a positividade para GFAP em células da glia de ratos (Elfvin, Bjorklund *et al.*, 1987). No nosso modelo, observamos e documentamos positividade por imunofluorescência para GFAP em culturas de células da glia. Acreditamos que nossa descrição seja pioneira em GCS de camundongos, o que foi confirmado cuidadosamente, através de concomitante marcação por peroxidase (imunocitoquímica) em culturas e em cortes histológicos de GCS (dados não mostrados).

Paralelamente à imunomarcação por GFAP, realizamos imunofluorescência e imunocitoquímica para S100, outro marcador de células da glia, em culturas e em gânglios (dados não mostrados). Não observamos imunopositividade nas culturas, no entanto, foram observadas células positivas para S100 nos gânglios, conforme descrito para células satélites de gânglios simpáticos de humanos (Gonzalez-Martinez, Perez-Pinera *et al.*, 2003) e de GCSs de ratos (Cocchia e Michetti, 1981). De modo interessante, evidências recentes demonstram a expressão da proteoglicana sulfato de condroitina NG2 em células satélites fusiformes e imunonegativas para S100 de gânglios e nervos periféricos (Rezajooi, Pavlides *et al.*, 2004). Embora não tenhamos testado a expressão de NG2 nas células da glia do GCS, pretendemos utilizar esse marcador para complementar a caracterização imunocitoquímica dessas células.

Considerando o comportamento das células da glia, suas conseqüências benéficas e/ou deletérias aos neurônios em culturas ou em patologias e a escassez de estudos abordando a proteção ou lesão neuronal após ativação da glia periférica, torna-se relevante estudar a resposta glial em situações de lesão neuronal, tal como a observada na Doença de Chagas.

Assim como observado para os macrófagos (Macmicking, Xie *et al.*, 1997), diferentes estímulos pró-inflamatórios e degenerativos podem induzir a expressão de iNOS e a produção de NO em células da glia (Saha e Pahan, 2006). Além disso, é importante ressaltar que a liberação de produtos por células da glia nos gânglios, onde estão em íntimo contato com corpos neuronais (Chiba e Williams, 1975), pode determinar grave comprometimento das funções e das estruturas nervosas. Principalmente nas lesões da fase aguda da infecção por

T. cruzi, descritas na parede intestinal (Arantes, Marche *et al.*, 2004), é importante esclarecer a participação da glia na gênese das lesões do plexo mientérico.

Uma vez que demonstramos o papel do NO derivado de macrófagos nas lesões de neurônios simpáticos na infecção por *T. cruzi in vitro*, passamos a estudar a produção de NO por células da glia infectadas por *T. cruzi* e ativadas por IFN- γ para tentar atribuir à glia dos gânglios simpáticos papel potencialmente lesivo ou protetor aos neurônios. O comportamento da glia foi comparado ao dos macrófagos em experimentos pareados, tendo em vista que a resposta da glia periférica não está bem estabelecida, contrariamente à dos macrófagos em resposta a diversos estímulos, inclusive à infecção por *T. cruzi in vitro*. Nossas culturas de macrófagos apresentaram-se com aspecto morfológico característico e apresentaram positividade para o marcador de macrófago F4/80, o que está de acordo com a literatura (Hoefsmit, Schadee-Eestermans *et al.*, 1986).

Os experimentos de infecção das culturas de células da glia foram bem sucedidos em mostrar que a glia é susceptível à infecção pelo *T. cruzi* e torna-se intensamente parasitada, conforme evidenciado anteriormente (Tafuri, 1970; Tanowitz, Brosnan *et al.*, 1982; Da Mata, Camargos *et al.*, 2000; Arantes, Marche *et al.*, 2004). O grande número de amastigotas presentes nas células da glia às 48 horas p.i, cujo citoplasma apresentou-se com aspecto vacuolizado, e o aspecto íntegro da glia indica que essas células merecem ser estudadas quanto aos mecanismos de entrada do *T. cruzi* já descritos para células não fagocíticas de mamíferos (Burleigh e Andrews, 1998; Andrade e Andrews, 2004; 2005) e para macrófagos (Milder e Kloetzel, 1980). A capacidade fagocítica dessas células de citoplasma muito amplo, bem como os aspectos da organização de seu citoesqueleto precisam ser melhor compreendidos e podem oferecer evidências adicionais do mecanismo utilizado pelo parasita para a invasão ou de seus mecanismos de escape. Além da efetiva infecção nas culturas de células da glia, observamos que muitas células infectadas apresentaram-se imunopositivas para iNOS, indicando por abordagem microscópica que essas células estariam produzindo NO em resposta à infecção por *T. cruzi* e ativação por IFN- γ .

Ao analisar comparativamente a infecção por *T. cruzi* nas culturas de células da glia e nas culturas de macrófagos, observamos que maior quantidade de células da glia apresentou-se parasitada em relação aos macrófagos, o que foi confirmado pela análise quantitativa. Além disso, observamos maior quantidade de amastigotas nos citoplasmas das células glia, embora a análise quantitativa não tenha evidenciado diferença estatística. Estudo utilizando macrófagos murinos *in vitro* observou que essas células podem suportar, sem morte celular, 1 a 10 parasitos em seus citoplasmas, e que são menos parasitadas do que outros tipos celulares

(Tanowitz, Wittner *et al.*, 1975), o que nós também observamos ao comparar macrófagos e células da glia em nossos ensaios. As células da glia no nosso modelo apresentaram-se sem sinais indicativos de degeneração ou morte, na presença de grande número de parasitos internalizados.

A princípio, poderíamos sugerir que a produção de NO, importante no controle da multiplicação intracelular do parasito (Gazzinelli, Oswald *et al.*, 1992; Vespa, Cunha *et al.*, 1994), estaria comprometida na glia, o que não foi posteriormente comprovado e será discutido a seguir. Acreditamos que outros fatores podem ser responsáveis pelas divergências observadas na infecção dos dois tipos celulares. Os macrófagos são células com volume citoplasmático menor em comparação às células da glia, e são naturalmente mais especializados na resistência a infecções intracelulares do que outras células (Tanowitz, Wittner *et al.*, 1975). Além disso, o modo de internalização do parasito, conforme mencionado anteriormente, e a síntese e secreção de mediadores envolvidos na resposta celular ao *T.cruzi*, tais como leucotrieno B4 (Talvani, Machado *et al.*, 2002), TNF- α (Silva, Vespa *et al.*, 1995), interleucina 12 (IL-12) (Aliberti, Cardoso *et al.*, 1996) e quimiocinas (Aliberti, Machado *et al.*, 1999), podem justificar a maior infecção da glia em relação ao macrófago. Esses aspectos tornam-se objeto de investigação obrigatória, como desdobramento e contribuição de nosso trabalho.

Com os resultados da observação da imunofluorescência para iNOS, foi possível evidenciar que os macrófagos positivos apresentaram uma intensidade de coloração mais intensa do que a observada nas células da glia positivas, sugerindo maior quantidade da proteína expressa, embora esses dados não tenham sido quantificados. Alguns estudos indicam que a regulação de gene que codifica a iNOS em células da glia é diferenciada da que ocorre em células do sistema imune, como os macrófagos (Pahan, Namboodiri *et al.*, 1997; Pahan, Sheikh *et al.*, 1998). Apenas a realização de técnicas como PCR e *Western-blot* para a detecção do RNAm para iNOS e da enzima propriamente dita (Santos, Andrade *et al.*, 2006) poderiam fornecer resultados definitivos. Devido à dificuldade em obter número de células compatíveis com essas metodologias, não foi possível confirmar esses dados, pelo menos até este momento.

Com relação à produção de NO, nossos resultados pareados em macrófagos e glia mostraram inequivocamente que baixas densidades celulares não apresentaram dosagens de nitrito biologicamente significativas às 48 horas p.i. em nenhuma das condições, tanto nos experimentos de infecção por *T.cruzi* quanto nos experimentos de ativação por LPS. Uma vez que macrófagos ativados por LPS e IFN- γ são capazes de produzir NO em grandes

concentrações (Stuehr e Marletta, 1985), nós mostramos que a ausência de NO com densidade celular de 10^4 células/poço não significa ausência de produção de NO, mas sim, que as quantidades de nitrito produzidas não são passíveis de detecção pelo método de Griess (Green, Tannenbaum *et al.*, 1981), que tem limite de sensibilidade em torno de 2 μ M para fluidos fisiológicos (Tarpey, Wink *et al.*, 2004). A utilização dos macrófagos infectados por *T.cruzi* ou ativados por LPS, na mesma densidade celular, com ativação subsequente por IFN- γ , foi um controle importante da produção de NO e da detecção de dosagens de nitrito nas culturas de células da glia, uma vez que não há dados sobre esse tipo celular e a produção de NO.

Com as evidências de ausência de dosagem de nitrito nos controles positivos, passamos a utilizar 10^5 células/poço. Paralelamente, experimentos com macrófagos infectados por *T.cruzi* ou ativados por LPS na mesma densidade celular foram novamente utilizados como controles da produção de NO. Tendo em vista que a detecção de NO apresentava-se de extrema importância nesses experimentos, reproduzimos o protocolo de recrutamento de macrófagos por injeção intraperitoneal de tioglicolato e de plaqueamento 24 horas antes das intervenções, que foi utilizado em diversos estudos (Stuehr e Marletta, 1985; Liew, Li *et al.*, 1991; Assreuy, Cunha *et al.*, 1994; Talvani, Machado *et al.*, 2002) para avaliar a dosagem de nitrito no sobrenadante de células em cultura e validar os nossos resultados obtidos para a glia.

Utilizamos culturas de macrófagos apenas ativadas por IFN- γ , apenas infectadas por *T.cruzi* ou apenas ativadas por LPS como controles intra-experimentais da adição individual de cada um desses fatores (dados não mostrados). Observamos dosagens de nitrito significativamente superiores aos controles apenas nas culturas de macrófagos ativadas por IFN- γ , que, no entanto, apresentou-se significativamente mais baixa que a observada na condição experimental de interesse (culturas de macrófagos infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ). A adição individual de IFN- γ foi descrita como eficiente na produção de NO por macrófagos peritoneais *in vitro* (Denis, 1991), conforme observado por nós. As condições controles citadas acima não foram realizadas para as células da glia com densidade celular de 10^5 células/poço em função da quantidade limitada de células e da otimização de sua utilização para a condição experimental em estudo.

As culturas de células da glia (10^5 células/poço) infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ apresentaram dosagens de nitrito estatisticamente superiores aos controles às 48 horas p.i.. Similarmente, as culturas de macrófagos infectadas por *T.cruzi* e ativadas por IFN- γ , com

a mesma densidade celular, apresentaram dosagens significativamente mais altas que os seus controles. Ao comparar a produção de NO entre as células da glia e os macrófagos submetidos às mesmas condições, observamos dosagens de nitrito em níveis bastante semelhantes. Esses dados demonstram que as células da glia do GCS foram capazes de produzir NO em resposta à infecção por *T.cruzi* *in vitro* de modo semelhante aos macrófagos, apesar da maior taxa de infecção. Podemos inferir que a atividade tripanocida das células da glia esteja comprometida, independentemente da produção de NO, tendo em vista que estão mais infectadas do que os macrófagos que produzem quantidades similares de NO. Além disso, supomos que níveis de NO proporcionais às taxas de infecção poderiam significar uma menor capacidade de produção de NO pelas células da glia, em comparação com macrófagos.

Foi descrito que a produção de NO em microgliócitos infectados por *T.gondii* foi menor do que em microgliócitos vizinhos não infectados (Rozenfeld, Martinez *et al.*, 2005), o que poderia explicar, no nosso modelo, a produção de NO proporcionalmente mais baixa nas culturas de células da glia em comparação com os macrófagos, uma vez que 40 % das células da glia apresentam-se infectadas. No entanto, através da imunofluorescência para iNOS, não conseguimos observar diferenças na expressão da enzima entre células da glia infectadas e não infectadas.

Com relação à ativação por LPS e IFN- γ , as células da glia (10^5 células/poço) não apresentaram dosagens de nitrito estatisticamente superiores às observadas nos controles, demonstrando resposta diferencial da glia frente à infecção por *T.cruzi* e à ativação por LPS, quanto à produção de NO. Além disso, os níveis absolutos de nitrito dosados na infecção por *T.cruzi* (8 μ M) foram superiores aos observados na ativação por LPS (3,5 μ M). Embora diferenças estatísticas não tenham sido detectadas, esse fato tem relevância biológica, uma vez que sugere mecanismos de ativação distintos, conforme discutido a seguir.

Em contrapartida, as culturas de macrófagos ativadas por LPS e por IFN- γ apresentaram dosagem de nitrito estatisticamente superior aos seus controles e à observada nas culturas de células da glia ativadas por LPS e por IFN- γ . Adicionalmente, os macrófagos produziram quantidades estatisticamente superiores de NO em resposta à ativação por LPS (20 μ M) do que à infecção por *T.cruzi* (8,5 μ M), o que corrobora demonstrações anteriores de que mecanismos de ativação distintos estão envolvidos através da ativação de diferentes receptores de superfície (Ropert, Almeida *et al.*, 2001).

Os mecanismos moleculares da ativação macrofágica por LPS envolvem diversas quinases e as 3 classes de MAPK: ERK 1 e 2 (Weinstein, Sanghera *et al.*, 1992), p38 (Han,

Lee *et al.*, 1994) e JNK (Hambleton, Weinstein *et al.*, 1996). O receptor envolvido na ativação de macrófagos por LPS é o TLR 4 (Poltorak, He *et al.*, 1998; Hoshino, Takeuchi *et al.*, 1999; Qureshi, Lariviere *et al.*, 1999). Os eventos intracelulares incluem a proteína adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) (Muzio, Ni *et al.*, 1997; Wesche, Henzel *et al.*, 1997; Burns, Martinon *et al.*, 1998; Medzhitov, Preston-Hurlburt *et al.*, 1998), a família de quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK), e uma outra proteína adaptadora, o fator 6 ativado pelo receptor de TNF (TRAF6) (Fujihara, Muroi *et al.*, 2003). O TRAF6 ativa as MAPK quinases ERK e JNK, que levam à ativação da AP-1. Além disso, o TRAF6 ativa a degradação do complexo quinase da quinase I κ B, que libera o NF- κ B para a translocação ao núcleo e a ativação da transcrição de diversos genes, juntamente com a AP-1 (Baeuerle e Henkel, 1994; Karin, 1998).

Adicionalmente, o LPS induz síntese de fatores de transcrição e aumenta a função do STAT 1, através de fosforilação seletiva (Sweet e Hume, 1996; Lodie, Savedra *et al.*, 1997; Kovarik, Stoiber *et al.*, 1998). A STAT1 é essencial para a expressão do gene de iNOS após ativação por LPS em macrófagos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Embora o LPS seja um potente indutor de NF- κ B, que pode ativar a transcrição do gene da iNOS, esse sinal é insuficiente para a indução máxima desse gene. O STAT1 colabora, então, com o NF- κ B na ativação transcricional do gene da iNOS após estimulação por LPS (Ohmori e Hamilton, 2001).

Após infecção por *T.cruzi* e ativação por IFN- γ , os macrófagos produzem NO através de diversas vias de sinalização. No nível pré-transcricional e transcricional, ocorre ativação dos 3 tipos de MAPK e, conseqüentemente, de STAT1, AP-1 e NF- κ B, de modo semelhante ao que ocorre na ativação por LPS. Da mesma maneira, a ativação individual de NF- κ B também não é suficiente para a produção de NO após infecção por *T.cruzi*, sendo que o STAT1 é o principal fator transcricional que necessita de ativação para produção de NO. No entanto, a expressão máxima de iNOS requer também a ativação de NF- κ B. A infecção por *T.cruzi* e a concomitante ativação por IFN- γ levam à fosforilação total dos 3 tipos de MAPK e à ativação completa dos fatores de transcrição e sua translocação ao núcleo, levando à ativação do gene de iNOS e à conseqüente produção de NO (Ropert, Almeida *et al.*, 2001).

Além disso, o aumento da estabilidade pós-transcricional do RNAm para iNOS é necessário à expressão máxima de iNOS após infecção por *T.cruzi* e ativação por IFN- γ . A estabilidade do RNAm apresentou-se mais prolongada em macrófagos infectados por *T.cruzi* e ativados por IFN- γ do que em macrófagos apenas ativados por IFN- γ . Na infecção por

T. cruzi, o RNAm para iNOS é estabilizado por ERK1/ERK2 e JNK (Bergeron e Olivier, 2006), contrariamente ao que ocorre após ativação por LPS, uma vez que, nesse caso, a estabilidade do RNAm para iNOS é dependente de ERK1/ERK2 e p38 (Bhat, Zhang *et al.*, 1998).

Paralelamente à infecção pelo parasito propriamente dito, foi demonstrado que as âncoras de GPI de *T. cruzi* são capazes de levar a um padrão de ativação similar ao observado para o LPS e para o parasito, pois ativam as 3 vias de sinalização envolvendo MAPK e desencadeiam a fosforilação do I κ B, fator inibidor da translocação do NF- κ B ao núcleo (Ropert, Almeida *et al.*, 2001). No entanto, a produção de NO não foi aumentada na ativação concomitante por LPS e GPI em relação à ativação por LPS ou GPI individualmente, sugerindo que a indução de NO por esses glicolípídeos microbianos segue diferentes vias de ativação, apesar de suas similaridades (Ropert, Almeida *et al.*, 2001).

Foi demonstrado que os receptores ativados por LPS e GPI são distintos: a GPI é agonista de TLR 2, enquanto o LPS ativa TLR 4 (Ropert, Almeida *et al.*, 2001). Apesar de que todos os TLRs ativam cascatas de sinalização similares envolvendo MAPKs e NF- κ B, as respostas não são idênticas. A ativação de TLR 2 e TLR 4 acarreta diferenças qualitativas e quantitativas. O TLR 2, contrariamente ao TLR 4, mostrou ser essencial na indução de IL-12, TNF- α e NO por macrófagos murinos (Campos, Almeida *et al.*, 2001) e humanos (Ropert, Ferreira *et al.*, 2002) ativados por GPI. Além disso, foi demonstrado que o TLR 2 não participa na sinalização por LPS em macrófagos (Fujihara, Muroi *et al.*, 2003).

A ativação de TLR distintos demonstra que, apesar da participação de cascatas de proteínas quinases e fatores de transcrição semelhantes, as sinalizações intracelulares estimuladas por *T. cruzi* e LPS em macrófagos são distintas, o que provê uma base racional para nossos achados de dosagens de nitrito diferentes após esses estímulos em macrófagos.

Enquanto as vias de ativação de iNOS em macrófagos foram bem estudadas e descritas, os eventos moleculares que levam à expressão de iNOS em células da glia não estão completamente esclarecidos (Saha e Pahan, 2006). Assim como em macrófagos, grande número de estímulos pode induzir a expressão de iNOS em células da glia. Esses estímulos incluem produtos bacterianos e virais, citocinas, contato célula-célula, toxinas neurodegenerativas e outros insultos que ocorrem em doenças neurodegenerativas. A regulação da expressão gênica de iNOS parece ser diferente entre astrócitos e macrófagos (Pahan, Namboodiri *et al.*, 1997; Pahan, Sheikh *et al.*, 1998).

A expressão da iNOS na glia é regulada principalmente a nível transcricional, como no macrófago, podendo ser também modulada nos níveis pós-transcricionais, traducionais e pós-

tradicionais. Diversas cascatas de sinalização foram relacionadas à expressão de iNOS na glia no nível transcricional, dentre as quais podemos citar a regulação do promotor do gene da iNOS, que depende da concentração de NF- κ B que transloca para o núcleo, e o envolvimento de outros fatores de transcrição como AP-1 e STAT1, que atuam em conjunto com o NF- κ B na ativação de iNOS (Jana, Anderson *et al.*, 2005). Em astrócitos e microgliócitos, a ativação de iNOS parece envolver os 3 tipos de MAPK, como já descrito para os macrófagos, que se combinam em diferentes vias de acordo com o estímulo indutor. A ativação de iNOS por LPS nessas células ativa as vias ERK e p38. Interessantemente, o adenosina monofosfato cíclico (AMPC), um dos principais mensageiros secundários intracelulares, induz a expressão de iNOS em macrófagos (Sowa e Przewlocki, 1994), enquanto inibe essa expressão em células da glia (Pahan, Namboodiri *et al.*, 1997) após estímulos por LPS, através da inibição da MAPK p38.

Além dessa regulação a nível transcricional, pode ocorrer o controle pós-transcricional de iNOS em células da glia, como a estabilidade do RNAm (Barger, Chavis *et al.*, 2000; Jeohn, Chang *et al.*, 2000; Park, Park *et al.*, 2003), conforme anteriormente descrito no macrófago.

As células da glia, assim como os macrófagos, respondem ao LPS por ativação do TLR 4, que é expresso em astrócitos e microgliócitos (Bowman, Rasley *et al.*, 2003; Lehnardt, Massillon *et al.*, 2003). No entanto, o envolvimento do TLR 4 na ativação de iNOS por LPS nessas células ainda não foi determinado. Adicionalmente ao LPS, DNA bacteriano demonstrou estimular a expressão de iNOS em células da glia de murinos através da ativação do TLR 9, que também é expresso nesses tipos celulares (Dalpke, Schafer *et al.*, 2002; Hosoi, Suzuki *et al.*, 2004). Astrócitos de murinos em culturas expressam constitutivamente RNAm para TLR 2, TLR 4, TLR 5 e TLR 9. Essa expressão apresentou-se exacerbada após a estimulação com produtos bacterianos (Bowman, Rasley *et al.*, 2003). Paralelamente, microgliócitos apresentaram RNAm para todos os tipos de TLR já descritos, TLR 1 a TLR 9 (Olson e Miller, 2004).

Conforme já mencionado, estudo abordando a infecção por *T.gondii* revelou que a produção de NO foi reduzida em microgliócitos infectados, sendo que seus vizinhos não infectados apresentaram expressão de iNOS. A inibição da produção de NO e da expressão de iNOS se correlacionou com a recuperação do crescimento de neuritos quando neurônios foram co-cultivados com microgliócitos infectados por *T.gondii* e ativados por IFN- γ (Rozenfeld, Martinez *et al.*, 2005). Na infecção por *Trypanosoma brucei*, astrócitos e microgliócitos apresentaram expressão de iNOS por imunofluorescência e produção de NO

por dosagem de nitrito no sobrenadante após concomitante ativação por IFN- γ (Girard, Ayed *et al.*, 2000).

As observações referidas dizem respeito à astrócitos e microgliócitos ativados, e apesar de implicarem em alguma consequência no entendimento dos mecanismos que estão operando na glia do GCS, não podem ser aplicadas indiscriminadamente.

Com relação às células da glia periférica, foi descrito que as células de Schwann expressam TLR 4 em resposta à ativação por LPS, e que essa expressão é essencial à resposta da glia ao produto bacteriano através da ativação das vias de sinalização das MAPK (Cheng, Qin *et al.*, 2007). Além disso, neurônios em necrose foram capazes de induzir a expressão de iNOS e TNF- α em células de Schwann, através de p38 e JNK e expressão de TLR 2 e TLR 3 (Lee, Jo *et al.*, 2006).

Com relação à infecção por *T.cruzi*, pouquíssimos relatos abordam as células da glia e não há descrições sobre a ativação ou produção de NO nessas células frente à infecção. Em oposição ao que ocorre em outros tipos celulares, as células de Schwann infectadas por *T.cruzi* não sofrem morte celular. Contrariamente, o *T.cruzi* as protege contra apoptose. Essa proteção é mediada pela trans-sialidase do parasito através da ativação da sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/quinase Akt, que induz a sobrevivência em diversos tipos celulares, inclusive nas células de Schwann (Furnari, Lin *et al.*, 1997; Skorski, Bellacosa *et al.*, 1997; Wu, Senechal *et al.*, 1998; Weiner e Chun, 1999). Essa sinalização anti-apoptótica é dependente de formas tripomastigotas invasivas, o que correlaciona a capacidade de invasão do parasito à ativação da sinalização de quinase Akt nas células de Schwann (Chuenkova e Pereira, 2001).

Conforme mencionado, o LPS ativa TLR 4 em macrófagos e células da glia, no entanto não se sabe se o *T.cruzi* ativa produção de NO na glia e se essa produção ocorre por ativação do TLR 2, como nos macrófagos. Considerando que moléculas de origem bacteriana como LPS e DNA são capazes de induzir a expressão de diferentes TLR em células da glia, sugerimos que a sinalização ativada pelo *T.cruzi* e pelo LPS sejam distintas em nossas células da glia, como já demonstrado para o macrófago, o que poderia explicar a diferença na produção de NO após esses estímulos.

Da mesma maneira que as vias de sinalização diferem entre os diferentes estímulos e o controle da produção de citocinas e de mediadores inflamatórios, como o NO, varia de célula para célula (Ropert, Ferreira *et al.*, 2002), acreditamos que as vias de sinalização entre macrófagos e células da glia podem diferir, sobretudo no que diz respeito à célula da glia periférica. Essas observações abrem perspectivas para estudos posteriores, sobretudo quanto

à sinalização celular e ativação de TLRs na infecção por *T.cruzi*, em função da importância patogenética da produção de NO e da lesão neuronal na Doença de Chagas e do papel da glia na lesão ou proteção neuronal nesse contexto.

7 CONCLUSÕES

Em vista dos argumentos apresentados com relação à lesão de neurônios simpáticos, afirmamos que o NO derivado da enzima iNOS está diretamente envolvido no mecanismo de lesão neuronal *in vitro* mediado por macrófagos infectados por *T.cruzi* e ativados por IFN- γ . O NO é capaz de acarretar morte neuronal por necrose e apoptose e comprometimento das terminações nervosas, sendo, dessa forma, proposto como importante mecanismo de morte neuronal atuante na patogênese das megavísceras na Doença de Chagas. Em contrapartida, não foi possível atribuir um papel definido para o TNF- α na lesão neuronal observada no nosso modelo.

Nossos resultados obtidos com culturas de glia do GCS, sua caracterização morfológica e imunocitoquímica e a resposta funcional à infecção por *T.cruzi* e ativação por IFN- γ são dados originais relacionados à estrutura e função das células da glia do GCS. Demonstramos que essas células são infectadas eficientemente por *T.cruzi in vitro*. As células da glia parecem exercer um papel relevante na lesão neuronal no contexto da Doença de Chagas, uma vez que são capazes de produzir NO após infecção por *T.cruzi* e ativação por IFN- $\gamma in vitro$.

Considerando que as células da glia produzem NO em quantidades semelhantes aos macrófagos após infecção por *T.cruzi* e ativação por IFN- γ , apesar da maior taxa de infecção, e que produzem quantidades significativamente menores de NO em comparação aos macrófagos quando ativadas por LPS e IFN- γ , sugerimos que os mecanismos de ativação e regulação da iNOS nessas células compartilham algumas vias comuns em resposta ao *T.cruzi*, enquanto na resposta ao LPS, esses mecanismos apontam diferenças que tem significado biológico e merecem ser investigados, principalmente no que diz respeito aos TLRs e às vias secundárias envolvidas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adad, S. J., C. G. Cancado, *et al.* Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. Virchows Arch, v.438, n.3, Mar, p.254-8. 2001.
- Alberts, B., A. Johnson, *et al.* Molecular Biology of the Cell New York, NY Garland Science. 2002
- Aliberti, J. C., M. A. Cardoso, *et al.* Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. Infect Immun, v.64, n.6, Jun, p.1961-7. 1996.
- Aliberti, J. C., F. S. Machado, *et al.* beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, v.67, n.9, Sep, p.4819-26. 1999.
- Almeida-Leite, C. M. D. Alterações induzidas por T.cruzi em culturas de neurônios do gânglio simpático cervical superior: papel do óxido nítrico derivado de macrófagos nas lesões neuronais. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004. 78 p.
- Altman, J. e G. D. Das. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol, v.124, n.3, Jun, p.319-35. 1965.
- Altman, J. e G. D. Das. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. J Comp Neurol, v.126, n.3, Mar, p.337-89. 1966.
- Alvarez, M. P., M. T. Solas, *et al.* Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity in cat satellite cells of sympathetic ganglia. Acta Anat (Basel), v.136, n.1, p.9-11. 1989.
- Andrade, L. O. e N. W. Andrews. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. J Exp Med, v.200, n.9, Nov 1, p.1135-43. 2004.
- Andrade, L. O. e N. W. Andrews. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. Nat Rev Microbiol, v.3, n.10, Oct, p.819-23. 2005.
- Arantes, R. M., S. Lourenssen, *et al.* Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro. Neuroreport, v.11, n.1, Jan 17, p.177-81. 2000.
- Arantes, R. M., H. H. Marche, *et al.* Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. Am J Pathol, v.164, n.4, Apr, p.1361-8. 2004.
- Aschner, M. e T. Syversen. Neurotoxicology: principles and considerations of in vitro assessment. Altern Lab Anim, v.32, n.4, Oct, p.323-7. 2004.
- Assreuy, J., F. Q. Cunha, *et al.* Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. Eur J Immunol, v.24, n.3, Mar, p.672-6. 1994.
- Baeuerle, P. A. e T. Henkel. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annu Rev Immunol, v.12, p.141-79. 1994.

Balligand, J. L., D. Ungureanu-Longrois, *et al.* Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. J Biol Chem, v.269, n.44, Nov 4, p.27580-8. 1994.

Barger, S. W., J. A. Chavis, *et al.* Dehydroepiandrosterone inhibits microglial nitric oxide production in a stimulus-specific manner. J Neurosci Res, v.62, n.4, Nov 15, p.503-9. 2000.

Barger, S. W., D. Horster, *et al.* Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.20, Sep 26, p.9328-32. 1995.

Barone, F. C. e A. A. Parsons. Therapeutic potential of anti-inflammatory drugs in focal stroke. Expert Opin Investig Drugs, v.9, n.10, Oct, p.2281-306. 2000.

Bergeron, M. e M. Olivier. Trypanosoma cruzi-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. J Immunol, v.177, n.9, Nov 1, p.6271-80. 2006.

Bhat, N. R., P. Zhang, *et al.* Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. J Neurosci, v.18, n.5, Mar 1, p.1633-41. 1998.

Blanchette, J., M. Jaramillo, *et al.* Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation. Immunology, v.108, n.4, Apr, p.513-22. 2003.

Blennerhassett, M. G. e J. Bienenstock. Sympathetic nerve contact causes maturation of mast cells in vitro. J Neurobiol, v.35, n.2, May, p.173-82. 1998.

Bowman, C. C., A. Rasley, *et al.* Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. Glia, v.43, n.3, Sep, p.281-91. 2003.

Bredt, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. Free Radic Res, v.31, n.6, Dec, p.577-96. 1999.

Burleigh, B. A. e N. W. Andrews. Signaling and host cell invasion by Trypanosoma cruzi. Curr Opin Microbiol, v.1, n.4, Aug, p.461-5. 1998.

Burns, K., F. Martinon, *et al.* MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. J Biol Chem, v.273, n.20, May 15, p.12203-9. 1998.

Camargo, M. M., I. C. Almeida, *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. J Immunol, v.158, n.12, Jun 15, p.5890-901. 1997.

Camargo, M. M., A. C. Andrade, *et al.* Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. J Immunol, v.159, n.12, Dec 15, p.6131-9. 1997.

Camargos, E. R., L. R. Haertel, *et al.* Preganglionic fibres of the adrenal medulla and cervical sympathetic ganglia: differential involvement during experimental American trypanosomiasis in rats. Int J Exp Pathol, v.77, n.3, Jun, p.115-24. 1996.

Camargos, E. R. e C. R. Machado. Morphometric and histological analysis of the superior cervical ganglion in experimental Chagas' disease in rats. Am J Trop Med Hyg, v.39, n.5, Nov, p.456-62. 1988.

Campenot, R. B. Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II Local control of neurite growth by nerve growth factor. Dev Biol, v.93, n.1, Sep, p.1-12. 1982.

Campos, M. A., I. C. Almeida, *et al.* Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol, v.167, n.1, Jul 1, p.416-23. 2001.

Carreno-Muller, E., A. J. Herrera, *et al.* Thrombin induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurones along with the activation of microglia. J Neurochem, v.84, n.5, Mar, p.1201-14. 2003.

Chan, J. R. Myelination: all about Rac 'n' roll. J Cell Biol, v.177, n.6, Jun 18, p.953-5. 2007.

Chandra, M., H. B. Tanowitz, *et al.* Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). Int J Parasitol, v.32, n.7, Jun 15, p.897-905. 2002.

Chandrasekar, B., P. C. Melby, *et al.* Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. Am J Pathol, v.152, n.4, Apr, p.925-34. 1998.

Chao, C. C., S. Hu, *et al.* Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. J Immunol, v.149, n.8, Oct 15, p.2736-41. 1992.

Chaudhary, P. M., C. Ferguson, *et al.* Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. Blood, v.91, n.11, Jun 1, p.4020-7. 1998.

Chen, G. e D. V. Goeddel. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science, v.296, n.5573, May 31, p.1634-5. 2002.

Cheng, C., Y. Qin, *et al.* Induction of TNF-alpha by LPS in Schwann Cell is Regulated by MAPK Activation Signals. Cell Mol Neurobiol, v.27, n.7, Nov, p.909-21. 2007.

Chiba, T. e T. H. Williams. Histofluorescence characteristics and quantification of small intensely fluorescent (SIF) cells in sympathetic ganglia of several species. Cell Tissue Res, v.162, n.3, Oct 13, p.331-41. 1975.

Chuenkova, M. V. e M. A. Pereira. The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. Neuroreport, v.12, n.17, Dec 4, p.3715-8. 2001.

Chuenkova, M. V. e M. Pereiraperrin. Chagas' disease parasite promotes neuron survival and differentiation through TrkA nerve growth factor receptor. J Neurochem, v.91, n.2, Oct, p.385-94. 2004.

Cocchia, D. e F. Michetti. S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. Cell Tissue Res, v.215, n.1, p.103-12. 1981.

Contestabile, A. e E. Ciani. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. Neurochem Int, v.45, n.6, Nov, p.903-14. 2004.

Conti, A., M. Miscusi, *et al.* Nitric oxide in the injured spinal cord: synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation. Brain Res Rev, v.54, n.1, Apr, p.205-18. 2007.

- Cummings, K. L. e R. L. Tarleton. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of Trypanosoma cruzi infection in mice. Infect Immun, v.72, n.7, Jul, p.4081-9. 2004.
- Cunha, F. Q., J. Assreuy, *et al.* Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. Immunology, v.79, n.3, Jul, p.408-11. 1993.
- Cunha, F. Q., S. Moncada, *et al.* Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. Biochem Biophys Res Commun, v.182, n.3, Feb 14, p.1155-9. 1992.
- Da Mata, J. R., M. R. Camargos, *et al.* Trypanosoma cruzi infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. Brain Res Bull, v.53, n.2, Sep 15, p.153-62. 2000.
- Dalpke, A. H., M. K. Schafer, *et al.* Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. J Immunol, v.168, n.10, May 15, p.4854-63. 2002.
- Dawson, M. R., J. M. Levine, *et al.* NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? J Neurosci Res, v.61, n.5, Sep 1, p.471-9. 2000.
- Dawson, T. M., V. L. Dawson, *et al.* A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. Ann Neurol, v.32, n.3, Sep, p.297-311. 1992.
- Dawson, V. L. e T. M. Dawson. Nitric oxide in neurodegeneration. Prog Brain Res, v.118, p.215-29. 1998.
- Denis, M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. Cell Immunol, v.132, n.1, Jan, p.150-7. 1991.
- Dewil, M., L. Van Den Bosch, *et al.* Microglia in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neurol Belg, v.107, n.3, Sep, p.63-70. 2007.
- Ding, A. H., C. F. Nathan, *et al.* Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J Immunol, v.141, n.7, Oct 1, p.2407-12. 1988.
- Drapier, J. C., J. Wietzerbin, *et al.* Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. Eur J Immunol, v.18, n.10, Oct, p.1587-92. 1988.
- Du Manoir, J. M., B. N. Albright, *et al.* Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. Vet Immunol Immunopathol, v.89, n.3-4, Oct 28, p.175-86. 2002.
- Elfvin, L. G., H. Bjorklund, *et al.* Neurofilament-like and glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivities in rat and guinea-pig sympathetic ganglia in situ and after perturbation. Cell Tissue Res, v.250, n.1, Oct, p.79-86. 1987.
- Eng, L. F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. J Neuroimmunol, v.8, n.4-6, Jun, p.203-14. 1985.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med, v.4, n.11, Nov, p.1313-7. 1998.

Eskes, C., L. Juillerat-Jeanneret, *et al.* Involvement of microglia-neuron interactions in the tumor necrosis factor- α release, microglial activation, and neurodegeneration induced by trimethyltin. J Neurosci Res, v.71, n.4, Feb 15, p.583-90. 2003.

Eyupoglu, I. Y., I. Bechmann, *et al.* Modification of microglia function protects from lesion-induced neuronal alterations and promotes sprouting in the hippocampus. Faseb J, v.17, n.9, Jun, p.1110-1. 2003.

Ferrari, I., M. J. Levin, *et al.* Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human β 1-adrenergic receptor. J Exp Med, v.182, n.1, Jul 1, p.59-65. 1995.

Foos, T. M. e J. Y. Wu. The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis. Neurochem Res, v.27, n.1-2, Feb, p.21-6. 2002.

Fujihara, M., N. Connolly, *et al.* Properties of protein kinase C isoforms (β II, ϵ , and ζ) in a macrophage cell line (J774) and their roles in LPS-induced nitric oxide production. J Immunol, v.152, n.4, Feb 15, p.1898-906. 1994.

Fujihara, M., M. Muroi, *et al.* Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. Pharmacol Ther, v.100, n.2, Nov, p.171-94. 2003.

Furnari, F. B., H. Lin, *et al.* Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.23, Nov 11, p.12479-84. 1997.

Gallo, F., M. C. Morale, *et al.* Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts on both neurons and glia to mediate the neurotrophic effects of astrocytes on LHRH neurons in culture. Synapse, v.36, n.4, Jun 15, p.233-53. 2000.

Garcia, S. B., J. S. Paula, *et al.* Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Exp Parasitol, v.93, n.4, Dec, p.191-7. 1999.

Garden, G. A. e T. Moller. Microglia biology in health and disease. J Neuroimmune Pharmacol, v.1, n.2, Jun, p.127-37. 2006.

Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, *et al.* The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . Eur J Immunol, v.22, n.10, Oct, p.2501-6. 1992.

Gibbins, I. L. Vasoconstrictor, vasodilator and pilomotor pathways in sympathetic ganglia of guinea-pigs. Neuroscience, v.47, n.3, p.657-72. 1992.

Girard, M., Z. Ayed, *et al.* In vitro induction of nitric oxide synthase in astrocytes and microglia by *Trypanosoma brucei*. Parasite Immunol, v.22, n.1, Jan, p.7-12. 2000.

Gomes, M. L., A. M. Macedo, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp Parasitol, v.88, n.1, Jan, p.28-33. 1998.

Gonzalez-Martinez, T., P. Perez-Pinera, *et al.* S-100 proteins in the human peripheral nervous system. Microsc Res Tech, v.60, n.6, Apr 15, p.633-8. 2003.

Gould, E., H. A. Cameron, *et al.* Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. J Neurosci, v.12, n.9, Sep, p.3642-50. 1992.

Green, L. C., S. R. Tannenbaum, *et al.* Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. Science, v.212, n.4490, Apr 3, p.56-8. 1981.

Greene, L. A. e A. S. Tischler. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.73, n.7, Jul, p.2424-8. 1976.

Gross, C. G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. Nat Rev Neurosci, v.1, n.1, Oct, p.67-73. 2000.

Gueneau, G., A. Privat, *et al.* Subgranular zone of the dentate gyrus of young rabbits as a secondary matrix. A high-resolution autoradiographic study. Dev Neurosci, v.5, n.4, p.345-58. 1982.

Hall, A. K. e S. C. Landis. Division and migration of satellite glia in the embryonic rat superior cervical ganglion. J Neurocytol, v.21, n.9, Sep, p.635-47. 1992.

Hambleton, J., S. L. Weinstein, *et al.* Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.7, Apr 2, p.2774-8. 1996.

Hamburger, V. The history of the discovery of the nerve growth factor. J Neurobiol, v.24, n.7, Jul, p.893-7. 1993.

Han, J., J. D. Lee, *et al.* A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science, v.265, n.5173, Aug 5, p.808-11. 1994.

Han, Y., J. Wang, *et al.* TNF-alpha down-regulates CXCR4 expression in primary murine astrocytes. Brain Res, v.888, n.1, Jan 5, p.1-10. 2001.

Hansson, E. e L. Ronnback. Glial neuronal signaling in the central nervous system. Faseb J, v.17, n.3, Mar, p.341-8. 2003.

Hashimoto, C., K. L. Hudson, *et al.* The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell, v.52, n.2, Jan 29, p.269-79. 1988.

Hedger, J. H. e R. H. Webber. Anatomical study of the cervical sympathetic trunk and ganglia in the albino rat (*Mus norvegicus albinus*). Acta Anat (Basel), v.96, n.2, p.206-17. 1976.

Heneka, M. T., D. L. Feinstein, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists protect cerebellar granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase. J Neuroimmunol, v.100, n.1-2, Dec, p.156-68. 1999.

Higuchi, M. D., M. M. Ries, *et al.* Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. Am J Trop Med Hyg, v.56, n.5, May, p.485-9. 1997.

Hoefsmit, E. C., I. L. Schadee-Eestermans, *et al.* The development of the resident pattern of endogenous peroxidatic activity in mouse peritoneal macrophages coincides with the expression of the differentiation antigen F4/80. A combined method for immunoperoxidase labeling and endogenous peroxidase cytochemistry. J Histochem Cytochem, v.34, n.5, May, p.633-40. 1986.

Hoshino, K., O. Takeuchi, *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol, v.162, n.7, Apr 1, p.3749-52. 1999.

Hosoi, T., S. Suzuki, *et al.* Bacterial DNA induced iNOS expression through MyD88-p38 MAP kinase in mouse primary cultured glial cells. Brain Res Mol Brain Res, v.124, n.2, May 19, p.159-64. 2004.

Hutchins, J. B. e S. W. Barger. Why neurons die: cell death in the nervous system. Anat Rec, v.253, n.3, Jun, p.79-90. 1998.

Iniguez, C., M. J. Gayoso, *et al.* A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye. J Neurosci Methods, v.13, n.1, Mar, p.77-86. 1985.

James, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. Microbiol Rev, v.59, n.4, Dec, p.533-47. 1995.

Jana, M., J. A. Anderson, *et al.* Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. Free Radic Biol Med, v.38, n.5, Mar 1, p.655-64. 2005.

Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v.54 Pt 1, p.1-13. 1989.

Janiszewski, J., J. Bienenstock, *et al.* Activation of rat peritoneal mast cells in coculture with sympathetic neurons alters neuronal physiology. Brain Behav Immun, v.4, n.2, Jun, p.139-50. 1990.

Jeohn, G. H., R. C. Chang, *et al.* Post-transcriptional inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by Go6976 in murine microglia. Brain Res Mol Brain Res, v.79, n.1-2, Jun 23, p.18-31. 2000.

Jessen, K. R. Glial cells. Int J Biochem Cell Biol, v.36, n.10, Oct, p.1861-7. 2004.

Jessen, K. R. e R. Mirsky. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. Nature, v.286, n.5774, Aug 14, p.736-7. 1980.

Jessen, K. R. e R. Mirsky. Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. J Neuroimmunol, v.8, n.4-6, Jun, p.377-93. 1985.

Jessen, K. R., R. Thorpe, *et al.* Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. J Neurocytol, v.13, n.2, Apr, p.187-200. 1984.

Jonakait, G. M. Neural-immune interactions in sympathetic ganglia. Trends Neurosci, v.16, n.10, Oct, p.419-23. 1993.

Kaplan, M. S. e J. W. Hinds. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. Science, v.197, n.4308, Sep 9, p.1092-4. 1977.

Karin, M. The NF-kappa B activation pathway: its regulation and role in inflammation and cell survival. Cancer J Sci Am, v.4 Suppl 1, May, p.S92-9. 1998.

Katsuse, O., E. Iseki, *et al.* Immunohistochemical study of the expression of cytokines and nitric oxide synthases in brains of patients with dementia with Lewy bodies. Neuropathology, v.23, n.1, Mar, p.9-15. 2003.

Katz, M. A., T. Barrette, *et al.* Hydraulic conductivity of basement membrane with computed values for fiber radius and void volume ratio. Am J Physiol, v.263, n.5 Pt 2, Nov, p.H1417-21. 1992.

Keilhoff, G., H. Fansa, *et al.* Nitric oxide synthase, an essential factor in peripheral nerve regeneration. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), v.49, n.6, Sep, p.885-97. 2003.

- Kempermann, G., H. G. Kuhn, *et al.* Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.19, Sep 16, p.10409-14. 1997.
- Kennedy, P. G. Neural cell markers and their applications to neurology. J Neuroimmunol, v.2, n.1, Jan, p.35-53. 1982.
- Khoury, E. L., V. Ritacco, *et al.* Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). Clin Exp Immunol, v.36, n.1, Apr, p.8-15. 1979.
- Kierszenbaum, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. Clin Microbiol Rev, v.12, n.2, Apr, p.210-23. 1999.
- Kinugawa, K., T. Shimizu, *et al.* Transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in cultured neonatal rat cardiac myocytes. Circ Res, v.81, n.6, Dec, p.911-21. 1997.
- Kleinman, H. K., J. Graf, *et al.* Role of basement membranes in cell differentiation. Ann N Y Acad Sci, v.513, p.134-45. 1987.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, *et al.* Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. Biochemistry, v.21, n.24, Nov 23, p.6188-93. 1982.
- Ko, C. P., H. Burton, *et al.* Synaptic transmission between rat superior cervical ganglion neurons in dissociated cell cultures. Brain Res, v.117, n.3, Dec 3, p.461-85. 1976.
- Koberle, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. Adv Parasitol, v.6, p.63-116. 1968.
- Koberle, F. The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. Bull World Health Organ, v.42, n.5, p.739-43. 1970.
- Koberle, F. e A. F. De. [Mechanism of destruction of the neurons of the peripheral nervous system in Chagas' disease.]. Hospital (Rio J), v.57, Jun, p.1057-62. 1960.
- Koistinaho, J. c-fos protein-like immunoreactivity in cultured human glial cells. Neurosci Res, v.9, n.1, Sep, p.64-8. 1990.
- Korr, H., E. Siewert, *et al.* Characterization of astroglial cell proliferation in vitro and in vivo. Acta Histochem Suppl, v.42, p.245-50. 1992.
- Kovarik, P., D. Stoiber, *et al.* Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation. Embo J, v.17, n.13, Jul 1, p.3660-8. 1998.
- Kubota, Y., H. K. Kleinman, *et al.* Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. J Cell Biol, v.107, n.4, Oct, p.1589-98. 1988.
- Laerum, O. D., S. Steinsvag, *et al.* Cell and tissue culture of the central nervous system: recent developments and current applications. Acta Neurol Scand, v.72, n.6, Dec, p.529-49. 1985.
- Langer, J. C., P. A. Betti, *et al.* Smooth muscle from aganglionic bowel in Hirschsprung's disease impairs neuronal development in vitro. Cell Tissue Res, v.276, n.1, Apr, p.181-6. 1994.
- Laskin, D. L. e K. J. Pendino. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.35, p.655-77. 1995.

Latt, S. A. e G. Stetten. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. J Histochem Cytochem, v.24, n.1, Jan, p.24-33. 1976.

Lattime, E. C., A. Stoppacciaro, *et al.* Limiting dilution analysis of TNF producing cells in C3H/HeJ mice. J Immunol, v.141, n.10, Nov 15, p.3422-8. 1988.

Ledo, A., R. M. Barbosa, *et al.* Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.48, Nov 29, p.17483-8. 2005.

Lee, H., E. K. Jo, *et al.* Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration. Biochem Biophys Res Commun, v.350, n.3, Nov 24, p.742-7. 2006.

Lee, H., C. Park, *et al.* Double-stranded RNA induces iNOS gene expression in Schwann cells, sensory neuronal death, and peripheral nerve demyelination. Glia, v.55, n.7, May, p.712-22. 2007.

Lehnardt, S., L. Massillon, *et al.* Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.14, Jul 8, p.8514-9. 2003.

Lein, P. J., H. N. Beck, *et al.* Glia induce dendritic growth in cultured sympathetic neurons by modulating the balance between bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP antagonists. J Neurosci, v.22, n.23, Dec 1, p.10377-87. 2002.

Li, G. N., L. L. Livi, *et al.* Genomic and morphological changes of neuroblastoma cells in response to three-dimensional matrices. Tissue Eng, v.13, n.5, May, p.1035-47. 2007.

Li, M. L., J. Aggeler, *et al.* Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.84, n.1, Jan, p.136-40. 1987.

Liaudet, L., F. G. Soriano, *et al.* Biology of nitric oxide signaling. Crit Care Med, v.28, n.4 Suppl, Apr, p.N37-52. 2000.

Liew, F. Y., Y. Li, *et al.* A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. Eur J Immunol, v.21, n.10, Oct, p.2489-94. 1991.

Lindh, B., J. M. Lundberg, *et al.* NPY-, galanin-, VIP/PHI-, CGRP- and substance P-immunoreactive neuronal subpopulations in cat autonomic and sensory ganglia and their projections. Cell Tissue Res, v.256, n.2, p.259-73. 1989.

Lipton, S. A. Neuronal injury associated with HIV-1: approaches to treatment. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.38, p.159-77. 1998.

Liu, Y., L. Qin, *et al.* Dextromethorphan protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation. J Pharmacol Exp Ther, v.305, n.1, Apr, p.212-8. 2003.

Liutkiene, G., R. Stropus, *et al.* Structural changes of the human superior cervical ganglion following ischemic stroke. Medicina (Kaunas), v.43, n.5, p.390-8. 2007.

Lobsiger, C. S. e D. W. Cleveland. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. Nat Neurosci, v.10, n.11, Nov, p.1355-60. 2007.

Lodie, T. A., R. Savedra, Jr., *et al.* Stimulation of macrophages by lipopolysaccharide alters the phosphorylation state, conformation, and function of PU.1 via activation of casein kinase II. J Immunol, v.158, n.4, Feb 15, p.1848-56. 1997.

Lonchamp, E., J. L. Dupont, *et al.* The mouse cerebellar cortex in organotypic slice cultures: an in vitro model to analyze the consequences of mutations and pathologies on neuronal survival, development, and function. Crit Rev Neurobiol, v.18, n.1-2, p.179-86. 2006.

Ludlam, W. H., K. J. Chandross, *et al.* LIF-and IL-1 beta-mediated increases in substance P receptor mRNA in axotomized, explanted or dissociated sympathetic ganglia. Brain Res, v.685, n.1-2, Jul 10, p.12-20. 1995.

Machado, C. R., J. B. Alves, *et al.* Adrenergic innervation and noradrenaline content of the rat submandibular gland during the experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Neural Transm, v.59, n.4, p.289-97. 1984.

Machado, C. R., A. B. Machado, *et al.* Recovery from heart norepinephrine depletion in experimental Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg, v.27, n.1 Pt 1, Jan, p.20-4. 1978.

Machado, C. R. e A. L. Ribeiro. Experimental American trypanomiasis in rats: sympathetic denervation, parasitism and inflammatory process. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.84, n.4, Oct-Dec, p.549-56. 1989.

Machado, F. S., G. A. Martins, *et al.* *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. Circulation, v.102, n.24, Dec 12, p.3003-8. 2000.

Mackay, A. R., D. E. Gomez, *et al.* Identification of the 72-kDa (MMP-2) and 92-kDa (MMP-9) gelatinase/type IV collagenase in preparations of laminin and Matrigel. Biotechniques, v.15, n.6, Dec, p.1048-51. 1993.

Mackowiak, M., A. Chocyk, *et al.* Neurogenesis in the adult brain. Pol J Pharmacol, v.56, n.6, Nov-Dec, p.673-87. 2004.

Macmicking, J., Q. W. Xie, *et al.* Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol, v.15, p.323-50. 1997.

Madariaga-Domich, A. e J. Taxi. A comparative and quantitative study of small intensely fluorescent (SIF) cells in the sympathetic ganglia of some small mammals. Arch Anat Microsc Morphol Exp, v.75, n.1, p.1-17. 1986.

Magnusson, S., P. Alm, *et al.* Inducible nitric oxide synthase increases in regenerating rat ganglia. Neuroreport, v.7, n.12, Aug 12, p.2046-50. 1996.

Martin, D. P., R. E. Schmidt, *et al.* Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. J Cell Biol, v.106, n.3, Mar, p.829-44. 1988.

Masliukov, P. M. e J. P. Timmermans. Immunocytochemical properties of stellate ganglion neurons during early postnatal development. Histochem Cell Biol, v.122, n.3, Sep, p.201-9. 2004.

- Mcguire, P. G. e N. W. Seeds. The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. J Cell Biochem, v.40, n.2, Jun, p.215-27. 1989.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, *et al.* A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, v.388, n.6640, Jul 24, p.394-7. 1997.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. Mol Cell, v.2, n.2, Aug, p.253-8. 1998.
- Melcangi, R. C., M. Galbiati, *et al.* Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor-beta the principle involved? Endocrinology, v.136, n.2, Feb, p.679-86. 1995.
- Melo, R. C. e C. R. Machado. Depletion of radiosensitive leukocytes exacerbates the heart sympathetic denervation and parasitism in experimental Chagas' disease in rats. J Neuroimmunol, v.84, n.2, Apr 15, p.151-7. 1998.
- Mikami, S., S. Kawashima, *et al.* Expression of nitric oxide synthase in a murine model of viral myocarditis induced by coxsackievirus B3. Biochem Biophys Res Commun, v.220, n.3, Mar 27, p.983-9. 1996.
- Milder, R. e J. Kloetzel. The development of Trypanosoma cruzi in macrophages in vitro. Interaction with lysosomes and host cell fate. Parasitology, v.80, n.1, Feb, p.139-45. 1980.
- Miller, R. H. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. Prog Neurobiol, v.67, n.6, Aug, p.451-67. 2002.
- Moncada, S. e J. P. Bolanos. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. J Neurochem, v.97, n.6, Jun, p.1676-89. 2006.
- Moncayo, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.98, n.5, Jul, p.577-91. 2003.
- Morris, J. L., I. L. Gibbins, *et al.* Galanin-like immunoreactivity in sympathetic and parasympathetic neurons of the toad Bufo marinus. Neurosci Lett, v.102, n.2-3, Jul 31, p.142-8. 1989.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v.65, n.1-2, Dec 16, p.55-63. 1983.
- Munoz-Fernandez, M. A., M. A. Fernandez, *et al.* Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. Immunol Lett, v.33, n.1, Jun, p.35-40. 1992.
- Muroi, M. e T. Suzuki. Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. Cell Signal, v.5, n.3, May, p.289-98. 1993.
- Muzio, M., J. Ni, *et al.* IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. Science, v.278, n.5343, Nov 28, p.1612-5. 1997.
- Nagatsu, T., M. Mogi, *et al.* Cytokines in Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl, n.58, p.143-51. 2000.

- Ny, L., K. Persson, *et al.* Localization and activity of nitric oxide synthases in the gastrointestinal tract of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. J Neuroimmunol, v.99, n.1, Sep 1, p.27-35. 1999.
- Ohmori, Y. e T. A. Hamilton. Requirement for STAT1 in LPS-induced gene expression in macrophages. J Leukoc Biol, v.69, n.4, Apr, p.598-604. 2001.
- Okura, Y., T. Yamamoto, *et al.* Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. J Mol Cell Cardiol, v.29, n.2, Feb, p.491-502. 1997.
- Olson, J. K. e S. D. Miller. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. J Immunol, v.173, n.6, Sep 15, p.3916-24. 2004.
- Pacher, P., J. S. Beckman, *et al.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev, v.87, n.1, Jan, p.315-424. 2007.
- Pahan, K., A. M. Namboodiri, *et al.* Increasing cAMP attenuates induction of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. J Biol Chem, v.272, n.12, Mar 21, p.7786-91. 1997.
- Pahan, K., F. G. Sheikh, *et al.* Inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A differentially regulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat astrocytes and macrophages. J Biol Chem, v.273, n.20, May 15, p.12219-26. 1998.
- Park, E. J., S. Y. Park, *et al.* 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. J Biol Chem, v.278, n.17, Apr 25, p.14747-52. 2003.
- Perry, R. T., J. S. Collins, *et al.* The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, v.22, n.6, Nov-Dec, p.873-83. 2001.
- Perry, V. H. e M. C. Brown. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. Bioessays, v.14, n.6, Jun, p.401-6. 1992.
- Petersen, C. A., K. A. Krumholz, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. Infect Immun, v.74, n.3, Mar, p.1580-7. 2006.
- Petry, K. e W. C. Van Voorhis. Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimic mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease. Res Immunol, v.142, n.2, Feb, p.151-6. 1991.
- Pfeiffer, S. E., A. E. Warrington, *et al.* The oligodendrocyte and its many cellular processes. Trends Cell Biol, v.3, n.6, Jun, p.191-7. 1993.
- Pierchala, B. A., R. C. Ahrens, *et al.* Nerve growth factor promotes the survival of sympathetic neurons through the cooperative function of the protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. J Biol Chem, v.279, n.27, Jul 2, p.27986-93. 2004.
- Pinto, N. X., M. A. Torres-Hillera, *et al.* Immune response, nitric oxide, autonomic dysfunction and stroke: a puzzling linkage on *Trypanosoma cruzi* infection. Med Hypotheses, v.58, n.5, May, p.374-7. 2002.
- Poltorak, A., X. He, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science, v.282, n.5396, Dec 11, p.2085-8. 1998.

Popovich, P. G., Z. Guan, *et al.* Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. Exp Neurol, v.158, n.2, Aug, p.351-65. 1999.

Purves, D., G. J. Augustine, *et al.* Neuroscience. Sunderland, MA Sinauer Associates, Inc. 2001

Qureshi, S. T., L. Lariviere, *et al.* Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). J Exp Med, v.189, n.4, Feb 15, p.615-25. 1999.

Ramos-Ligonio, A., A. Lopez-Monteon, *et al.* Recombinant SSP4 protein from *Trypanosoma cruzi* amastigotes regulates nitric oxide production by macrophages. Parasite Immunol, v.26, n.10, Oct, p.409-18. 2004.

Reynolds, C. P. e J. R. Perez-Polo. Induction of neurite outgrowth in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by nerve growth factor. J Neurosci Res, v.6, n.3, p.319-25. 1981.

Rezajooi, K., M. Pavlides, *et al.* NG2 proteoglycan expression in the peripheral nervous system: upregulation following injury and comparison with CNS lesions. Mol Cell Neurosci, v.25, n.4, Apr, p.572-84. 2004.

Rock, F. L., G. Hardiman, *et al.* A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.2, Jan 20, p.588-93. 1998.

Roivainen, R. e J. Koistinaho. Decentralization induces long-term c-fos protein-like immunoreactivity in non-neuronal cells in the rat superior cervical ganglion. Neurosci Lett, v.119, n.1, Oct 30, p.105-8. 1990.

Roivainen, R. e J. Koistinaho. Histochemical detection of age- and injury-related changes in signal transduction in the superior cervical ganglion. Microsc Res Tech, v.35, n.1, Sep 1, p.20-31. 1996.

Ropert, C., I. C. Almeida, *et al.* Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. J Immunol, v.166, n.5, Mar 1, p.3423-31. 2001.

Ropert, C., L. R. Ferreira, *et al.* Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Microbes Infect, v.4, n.9, Jul, p.1015-25. 2002.

Rottenberg, M. E., E. Castanos-Velez, *et al.* Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. Eur J Immunol, v.26, n.12, Dec, p.3203-13. 1996.

Rozenfeld, C., R. Martinez, *et al.* *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma-activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta1 production by infected microglia. Am J Pathol, v.167, n.4, Oct, p.1021-31. 2005.

Saha, R. N. e K. Pahan. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. Antioxid Redox Signal, v.8, n.5-6, May-Jun, p.929-47. 2006.

Said, G. e M. Hontebeyrie-Joskowicz. Nerve lesions induced by macrophage activation. Res Immunol, v.143, n.6, Jul-Aug, p.589-99. 1992.

Santos, J. L., A. A. Andrade, *et al.* Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. J Interferon Cytokine Res, v.26, n.9, Sep, p.682-8. 2006.

Schaffer, D. V. e F. H. Gage. Neurogenesis and neuroadaptation. Neuromolecular Med, v.5, n.1, p.1-9. 2004.

Schreiber, R. C., S. A. Vaccariello, *et al.* A comparison of the changes in the non-neuronal cell populations of the superior cervical ganglia following decentralization and axotomy. J Neurobiol, v.53, n.1, Oct, p.68-79. 2002.

Silva, J. S., F. S. Machado, *et al.* The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. Front Biosci, v.8, May 1, p.s314-25. 2003.

Silva, J. S., G. N. Vespa, *et al.* Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. Infect Immun, v.63, n.12, Dec, p.4862-7. 1995.

Sippy, B. D., F. M. Hofman, *et al.* Increased expression of tumor necrosis factor-alpha receptors in the brains of patients with AIDS. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v.10, n.5, Dec 15, p.511-21. 1995.

Skaper, S. D. The Brain as a Target for Inflammatory Processes and Neuroprotective Strategies. Ann N Y Acad Sci, v.1122, Dec, p.23-34. 2007.

Skorski, T., A. Bellacosa, *et al.* Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. Embo J, v.16, n.20, Oct 15, p.6151-61. 1997.

Sowa, G. e R. Przewlocki. cAMP analogues and cholera toxin stimulate the accumulation of nitrite in rat peritoneal macrophage cultures. Eur J Pharmacol, v.266, n.2, Jan 15, p.125-9. 1994.

Starobinas, N., M. Russo, *et al.* Is TNF alpha involved in early susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected C3H/He mice? Res Immunol, v.142, n.2, Feb, p.117-22. 1991.

Sterin-Borda, L., J. Pascual, *et al.* [Interaction of antibodies with cardiac neurotransmitter receptors]. Medicina (B Aires), v.49, n.2, p.181-8. 1989.

Stuehr, D. J. e M. A. Marletta. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.22, Nov, p.7738-42. 1985.

Sweet, M. J. e D. A. Hume. Endotoxin signal transduction in macrophages. J Leukoc Biol, v.60, n.1, Jul, p.8-26. 1996.

Tafuri, W. L. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. Am J Trop Med Hyg, v.19, n.3, May, p.405-17. 1970.

Talvani, A., F. S. Machado, *et al.* Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in Trypanosoma cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. Infect Immun, v.70, n.8, Aug, p.4247-53. 2002.

Tanaka, J., K. Toku, *et al.* Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species. Glia, v.28, n.2, Nov, p.85-96. 1999.

- Tanowitz, H., M. Wittner, *et al.* Studies of in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. I. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. Am J Trop Med Hyg, v.24, n.1, Jan, p.25-33. 1975.
- Tanowitz, H. B., C. Brosnan, *et al.* Infection of organotypic cultures of spinal cord and dorsal root ganglia with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg, v.31, n.6, Nov, p.1090-7. 1982.
- Tanowitz, H. B., L. V. Kirchhoff, *et al.* Chagas' disease. Clin Microbiol Rev, v.5, n.4, Oct, p.400-19. 1992.
- Tarleton, R. L. e L. Zhang. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? Parasitol Today, v.15, n.3, Mar, p.94-9. 1999.
- Tarpey, M. M., D. A. Wink, *et al.* Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.286, n.3, Mar, p.R431-44. 2004.
- Tiffany-Castiglioni, E. Cell culture models for lead toxicity in neuronal and glial cells. Neurotoxicology, v.14, n.4, Winter, p.513-36. 1993.
- Toku, K., J. Tanaka, *et al.* Microglial cells prevent nitric oxide-induced neuronal apoptosis in vitro. J Neurosci Res, v.53, n.4, Aug 15, p.415-25. 1998.
- Trush, M. A., K. Van Dyke, *et al.* Chemiluminescence resulting from an interaction between imipramine and human polymorphonuclear leukocytes. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, v.18, n.4, Dec, p.645-64. 1977.
- Turtzo, L. C., R. Marx, *et al.* Cross-talk between sympathetic neurons and adipocytes in coculture. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.22, Oct 23, p.12385-90. 2001.
- Tyor, W. R., J. D. Glass, *et al.* Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Neurol, v.31, n.4, Apr, p.349-60. 1992.
- Vago, A. R., A. M. Macedo, *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. Am J Pathol, v.149, n.6, Dec, p.2153-9. 1996.
- Vanhatalo, S., A. Lumme, *et al.* Colchicine differentially induces the expressions of nitric oxide synthases in central and peripheral catecholaminergic neurons. Exp Neurol, v.150, n.1, Mar, p.107-14. 1998.
- Veerhuis, R., J. J. Hoozemans, *et al.* Adult human microglia secrete cytokines when exposed to neurotoxic prion protein peptide: no intermediary role for prostaglandin E2. Brain Res, v.925, n.2, Jan 25, p.195-203. 2002.
- Venezie, R. D., A. D. Toews, *et al.* Macrophage recruitment in different models of nerve injury: lysozyme as a marker for active phagocytosis. J Neurosci Res, v.40, n.1, Jan 1, p.99-107. 1995.
- Vespa, G. N., F. Q. Cunha, *et al.* Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. Infect Immun, v.62, n.11, Nov, p.5177-82. 1994.
- Von Bernhardi, R. Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. Neurotox Res, v.12, n.4, Dec, p.215-32. 2007.

Vukicevic, S., H. K. Kleinman, *et al.* Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. Exp Cell Res, v.202, n.1, Sep, p.1-8. 1992.

Wakshull, E., M. I. Johnson, *et al.* Postnatal rat sympathetic neurons in culture. II. Synaptic transmission by postnatal neurons. J Neurophysiol, v.42, n.5, Sep, p.1426-36. 1979.

Wang, M. J., W. W. Lin, *et al.* Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. Eur J Neurosci, v.16, n.11, Dec, p.2103-12. 2002.

Weiner, J. A. e J. Chun. Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.9, Apr 27, p.5233-8. 1999.

Weinstein, S. L., J. S. Sanghera, *et al.* Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. J Biol Chem, v.267, n.21, Jul 25, p.14955-62. 1992.

Wesche, H., W. J. Henzel, *et al.* MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. Immunity, v.7, n.6, Dec, p.837-47. 1997.

Wesselingh, S. L., C. Power, *et al.* Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. Ann Neurol, v.33, n.6, Jun, p.576-82. 1993.

Who. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser, v.905, p.i-vi, 1-109, back cover. 2002.

Wu, X., K. Senechal, *et al.* The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.26, Dec 22, p.15587-91. 1998.

Xie, Q. W., H. J. Cho, *et al.* Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Science, v.256, n.5054, Apr 10, p.225-8. 1992.

Young, H. M., R. B. Anderson, *et al.* Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. Auton Neurosci, v.112, n.1-2, May 31, p.1-14. 2004.

Yun, H. Y., V. L. Dawson, *et al.* Nitric oxide in health and disease of the nervous system. Mol Psychiatry, v.2, n.4, Jul, p.300-10. 1997.

Zhang, J., Z. A. Andrade, *et al.* Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. J Mol Cell Cardiol, v.31, n.3, Mar, p.581-96. 1999.

Zhang, L. e R. L. Tarleton. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. Eur J Immunol, v.26, n.1, Jan, p.102-9. 1996.

Zhou, T., B. Xu, *et al.* Neurons derived from PC12 cells have the potential to develop synapses with primary neurons from rat cortex. Acta Neurobiol Exp (Wars), v.66, n.2, p.105-12. 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)